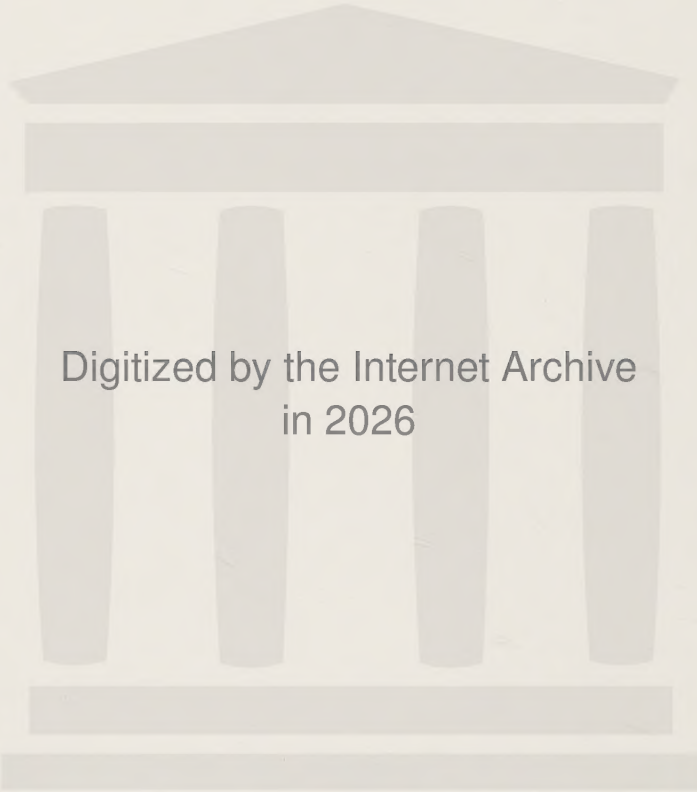


Amplifikation und Rearrangement
des c-myc Protooncogens
in strahleninduzierten Osteosarkomen
der Maus

Silvia Sturm

Disbui. München

1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Amplifikation und Rearrangement des c-myc Protooncogens
in strahleninduzierten Osteosarkomen der Maus**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig Maximilian Universität München

vorgelegt
von

Silvia Sturm

aus Augsburg
17.12.1987

1. Berichterstatter: Prof.Dr.Dr. U.Hagen
2. Berichterstatter: Prof.Dr. H.Cleve

Tag der mündlichen Prüfung: 8.6.1988

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Strahlenbiologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung München bei Prof. U.Hagen angefertigt.

Ich danke Prof. U.Hagen und allen Kollegen/innen in der Abteilung der molekularen Zellpathologie und der Pathologie der GSF, besonders Dr. Volker Erfle, Dr. Christine Leib-Mösch und Dr. Günter Strauss für Anregungen und Diskussionen. Dr. Martin Lipp der LMU München danke ich für die Plasmide U157/11 und S421/1, Dr. Anita Pecher für das pUC19-Plasmid.

Herzlich danke ich Luise Rieke für die Fotos.

Ich danke meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	7
Mat.2. Material	
Mat.2.2. Zellkultur	
Mat.2.3. DNA-Präparation hochmolekularer DNA	
Mat.2.4. Restriktionsenzym-Analyse	8
Mat.2.5. Hybridisierung	
Mat.2.6. Präparative DNA-Fragment-Isolierung	
Mat.2.7. Angereicherte Genbank im EMBL3A	9
Mat.2.9. Subklonierung	
Mat.2.10. Großpräparation von Plasmiden	10
Mat.2.11. RNA Slot-Blot und Northern-Blot	
2. Methoden	12
2.1. Primärtumoren OS, Primärtransplantate OTS, Transplantatlinien und Zelllinien	
2.2. Zellkultur	14
2.3. DNA-Präparation hochmolekularer DNA	15
2.4. Restriktionsenzym-Analyse	16
2.5. Hybridisierung von NC-Filtern und Biodyne-Membranen	18
2.6. Präparative DNA-Fragment-Isolierung	24
2.7. Konstruktion der angereicherten Genbank des Osteosarkoms TV im EMBL3A-Phagen	26
2.8. Isolierung des 20 kb EcoRI-Fragments des rekombinierten EMBL3A-Phagen	35
2.9. Subklonierung des EcoRI-Fragments des Osteosarkoms TV389/1 in das pUC19-Plasmid	36
2.10. Großpräparation von Plasmiden	38
2.11. RNA Slot-Blot und Northern-Blot	39
3. und 4. Ergebnisse	42
3. Veränderungen des c-myc Protooncogens in murinen Osteosarkomen	
3.1. Untersuchung muriner Osteosarkome auf veränderte Oncogene	
3.2. Veränderung des c-myc Oncogens in murinen Osteosarkomen	
3.2.1. Das rearrangierte und amplifizierte c-myc Gen im Osteosarkom der Transplantatlinie TV	
3.2.2. Das c-myc Oncogen in Primärtransplantaten OTS von strahleninduzierten Osteosarkomen der NMRI-Maus	48
3.2.3. Amplifikationsgrad des c-myc Oncogens in murinen Osteosarkomen der NMRI-Maus	52
3.2.4. Tumorgenese und Vergleich mit der Balb/c-Maus	56
3.3. Bereich der Amplifikation im Genom der murinen Osteosarkome der NMRI-Maus	57
3.4. Expression des c-myc Oncogens in murinen, strahleninduzierten Osteosarkomen	61

4.	Die Transplantatlinie TV als Beispiel für das Rearrangement des c-myc Oncogens in murinen Osteosarkomen	64
4.1.	Untersuchung der klonierten rc-myc Sequenzen des TV389/1	66
4.1.1.	Einteilung der klonierten E/E-Fragmente des TV389/1 in die Typen I und II	
4.1.2.	B/B-Subklone der E/E-Fragmente des Typs I und II	70
4.2.	Kartierung der Restriktionsenzymchnittstellen der E/E-Fragmente Typ I und II	73
4.2.1.	Identifizierung der äußeren und der zentralen Fragmente	
4.2.2.	Anordnung der B/B- und der V/V-Fragmente auf dem E/E-Gesamtabschnitt	77
4.2.3.	Kartierung der enzymespezifischen Schnittstellen von 10 Restriktionsenzymen	81
4.2.4.	Identifizierung der c-myc homologen Sequenzen auf dem klonierten E/E-Bereich Typ I und II des Tumors TV389/1	
4.2.5.	Vergleich der E/E-Fragmente Typ I und II mit der normalen Keimbahn-DNA	87
4.3.	Klonierte Sequenzen im Genom der Osteosarkome TV und OTS, und in der Keimbahn-DNA	88
4.3.1.	Typ I und Typ II im Genom der Tumoren und in der Keimbahn-DNA	90
4.3.2.	(r)c-myc Gene im Genom der Tumoren TV	94
4.3.3.	5' und 3' Nachbarbereich der (r)c-myc Gene im Tumor TV	98
5.	Diskussion	102
5.1.	Die Oncogene c-sis, c-mos und c-myc in murinen Osteosarkomen	
5.2.	Bereich der Amplifikation im Tumor-Genom	106
5.3.	Rearrangement des c-myc Protooncogens im strahleninduzierten Osteosarkom der Transplantatlinie TV	109
5.4.	Anordnung der Amplifikationseinheiten im Tumor TV	113
6.	Zusammenfassung	116
7.	Literatur	118

1. Einleitung

Bei der Tumorgenese führen komplexe Interaktionen zwischen exogenen und endogenen Faktoren zu der Entwicklung eines malignen Tumors. Bei den einzelnen Stadien der Initiation, der Promotion und der Progression des Tumors scheinen verschiedene Mechanismen im zellulären und genetischen Bereich eine Rolle zu spielen (WEINSTEIN et al 1984, SORRENTINO et al 1987, GOULD 1984, RABBITS 1985).

Ionisierende Strahlung und mutagene Chemikalien bewirken Strukturänderungen der zellulären DNA. Schwere Läsionen, die die Replikation und die Transkription hemmen, führen zum Tod der betroffenen Zelle. Ein Primärschaden der DNA, der nicht repariert oder falsch repariert wird, kann als somatische Mutation im Genom der Zelle fixiert werden. Wird dabei eine codierende Sequenz oder Kontrollelemente verändert, kann dies zur Initiation der Tumorgenese beitragen. Die Transformation einer einzelnen normalen Zelle in eine Tumorzelle, kann bereits zum klonalen Tumor führen (GOULD 1984, FEARON et al 1987). Die Tumorzellen unterliegen dabei nicht mehr der normalen Kontrolle der Zellteilung.

Ionisierende Strahlen verursachen verschiedene Strukturänderungen der DNA (HAGEN 1986, UPTON 1987). Bereits niedrige Strahlendosen führen zu Strangbrüchen, Zerstörung einzelner Basen und zu Quervernetzungen der beiden Stränge. In den Zellen werden primär strukturelle Chromosomenaberrationen beobachtet (BENDER 1984, SAWEY et al 1987). Eine falsche DNA-Reparatur kann zu Rearrangements und Translokationen von Genen führen.

α - und β -strahlende, osteotrope Radionuklide führen in der Maus und im Menschen zum Osteosarkom (SPIESS+MAYS 1970, MAYS+SPIESS 1984, LUZ 1980, MÜLLER et al 1986, MAYS et al 1986). Der molekulare Mechanismus, der nach ionisierender Strahlung zur Tumorgenese führt, ist nicht bekannt.

Es wurden jedoch Gene identifiziert, die allgemein bei der Tumorgenese

eine Rolle spielen. Diese Gene werden als Oncogene bezeichnet. Oncogene wurden sowohl in RNA-Tumoviren, den Retroviren, als auch im zellulären Genom von Eukaryonten nachgewiesen. Für die retroviralen Oncogene (v-onc) sind entsprechende, zelluläre Homologe, die Protooncogene (c-onc) identifiziert worden (DALLA-FAVERA et al 1982a, TAKEYA+HANAFUSA 1983, DUESBERG 1983). Zusätzlich zu den 20 viralen Oncogenen und ihren eukaryontischen Homologen wurden weitere zelluläre Protooncogene identifiziert (BISHOP 1985).

Die Protooncogene codieren für Proteine, die sich nach ihrer Lokalisation in der Zelle in drei Gruppen einteilen lassen: Zellmembran, Cytoplasma und Zellkern (HUNTER 1984). Die Proteine der Protooncogene scheinen für die normale Kontrolle der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung essentiell zu sein (WAGNER+MÜLLER 1986, VERMA + SASSONE-CORSI 1987, CLASSON et al 1987).

Die Aktivierung und Veränderung von Protooncogenen in Tumoren, wurde bei der Induktion durch Chemikalien, Viren und ionisierende Strahlung nachgewiesen (GUERRERO et al 1984a,b, MIZUKI et al 1985, YANDER et al 1985, SCHWAB et al 1985, SAWEY et al 1987). Aktivierte Oncogene sind in einer Vielzahl von malignen Tumoren beobachtet worden (WILLECKE+SCHÄFER 1984, BISHOP 1987, BARBACID 1986).

Protooncogene können bei Veränderung ihrer Information oder ihrer Expression zur Transformation einer Zelle führen.

Die erhöhte, unkontrollierte Expression eines Oncogenproteins, ohne Strukturänderung des Gens, wurde in verschiedenen Tumoren beschrieben (YANG et al 1985, SHOWE et al 1987). Möglicherweise spielen veränderte cis- oder trans-aktivierende Faktoren bei der erhöhten Expression eine Rolle (SHORT 1987, KINGSTON et al 1985, SASSONE-CORSI+BORELLI 1986, REMMERS et al 1986).

Häufig ist das aktivierte Oncogen im Kontrollbereich in seiner

genetischen Struktur verändert (RABBITS 1985, DUESBERG 1987). Dies kann die unkontrollierte Expression des normalen Genprodukts verursachen. Dabei gibt es mehrere Möglichkeiten, die zu einer veränderten Transkription des normalen Oncogens führen.

Ein Rearrangement, bei dem der nichtcodierende Bereich des Oncogens oder sein unmittelbarer Nachbarbereich mit fremden DNA-Sequenzen rekombiniert, kann durch verschiedene Mechanismen eine unkontrollierte Transkription des normalen Gens verursachen.

Bei der ersten wird das Gen von fremden Kontrollelementen (Enhancer und Promoter) aktiviert. Eine Aktivierung des c-myc Oncogens durch zelluläre Sequenzen wurde in Burkitt Lymphomen und Plasmacytomen gezeigt (KLEIN 1981, 1983, BERNARD et al 1983, MARCU et al 1985, CORCORAN et al 1985). Die Integration eines Retroviren, und damit seiner Kontrollelemente, führt ebenfalls zur Aktivierung eines Protooncogens (HAYWARD et al 1981, SELTEN et al 1984, CORCORAN et al 1984, LI et al 1984, STEFFEN 1984, GISSELBRECHT et al 1987).

Bei der zweiten Möglichkeit verursacht das Rearrangement im Oncogen, entweder die anormale Benützung eines eigenen, zweiten Promoters (Promotershift), oder die Benützung kryptischer Promotoren (STANTON et al 1983, TAUB et al 1984a,b, YANG et al 1985, MARCU et al 1985, PIECHACZYK et al 1985).

Durch das Rearrangement können auch negative 5' Kontrollelemente gestört werden, die die Transkription des Gens steuern (REMMERS et al 1986). Zum Beispiel kann in normalen Zellen die Elongation des c-myc Transkripts durch Sequenzen im 1. Exon und 1. Intron blockiert werden (NEPVEU+MARCUS 1986). Mutationen in diesem Bereich tragen möglicherweise zur Aktivierung des Gens in Burkitt Lymphomen bei (CESARMAN et al 1987). Wird beim Rearrangement das 3' Ende des Gens mit möglicherweise negativen Kontrollelementen im nichtcodierenden Bereich betroffen, kann die Stabilität und damit die Halbwertszeit der normalen mRNA in der



Zelle verändert werden (SHAW+KAMEN 1986, CLEMENS 1987, BRAWERMAN 1987, VERMA + SASSONI-CORSI 1987).

Das Rearrangement im Oncogen kann durch eine Deletion, Inversion oder Insertion bedingt sein. Die Translokation, bei der DNA-Segmente zwischen nicht homologen Chromosomen ausgetauscht werden, kann ebenfalls zu einem rearrangierten Oncogen führen.

Die Amplifikation eines Genortes, die zu zusätzlichen Kopien im Genom führt, kann eine erhöhte Transkriptionsrate des vervielfältigten Gens verursachen. Dies führt zu einem Überangebot des normalen Proteins (RABBITS 1985, MÄKELÄ+ALITALO 1986, COLE 1986).

Ein verändertes Genprodukt des Oncogens wird durch Mutationen im codierenden Bereich verursacht. Punktmutationen in den Protooncogenen aus der ras-Familie genügen für die Aktivierung in Tumoren (TABIN et al 1982, SHIMIZU et al 1983, YUASA et al 1983, FORRESTER et al 1987, HIRAI et al 1987, LIU et al 1987). Rearrangements und Translokationen können ebenfalls den codierenden Bereich des Gens treffen und zu einem veränderten Produkt führen. In leukämischen Zellen wurde ein verändertes Protein gezeigt, das aus der Fusion des translozierten c-abl Oncogens mit dem bcr Gen resultierte (SHTIVELMAN et al 1986, FAINSTEIN et al 1987). In Lymphosarkomen führte eine Virusintegration in das murine c-myb Oncogen, zu Fehlern im splicing der pre-mRNA und damit im Protein zur Insertion zusätzlicher Aminosäuren (ROSSON et al 1987).

In humanen und murinen Osteosarkomen wurde die Expression der Oncogene c-sis, c-mos und c-myc beobachtet (EVA et al 1982, GRAVES et al 1984, SCHWAB et al 1985, SCHÖN et al 1986 und YOKOTA et al 1986).

Eine Aktivierung des c-mos Oncogens wurde außerdem in murinen Plasmacytomen gefunden (RECHAVI et al 1982, CANAANI et al 1983, COHEN et al 1983, GATTONI-CELLI et al 1983). C-sis Transkripte wurden in transformierten hämatopoetischen Zellen und in Glioblastomen

nachgewiesen (EVA et al 1982, WESTIN et al 1982).

Eine Aktivierung des c-myc Protooncogens wurde in verschiedenen malignen Tumoren festgestellt. Das Gen unterliegt dabei zwei typischen Veränderungen, der Translokation und der Amplifikation.

Translokationen wurden in den folgenden Tumoren gefunden:

- Burkitt Lymphom und Plasmacytom (SHEN-ONG et al 1982, ADAMS et al 1982, 1983, DALLA-FAVERA et al 1982b, TAUB et al 1982, 1984a,b, CREWS et al 1982, LENOIR et al 1982, KLEIN 1981, 1983, NEEL et al 1982, HARRIS et al 1982, BATTEY et al 1983, DYSON+RABBITTS 1985, MOAV et al 1986, CROCE 1987, CROCE+NOWELL 1985, HARTL+LIPP 1987);
- T-Zell Leukämie (ERIKSON et al 1986, McKEITHAN et al 1986, FINGER et al 1986, CROCE 1987).

Die Translokation im Burkitt Lymphom und im Plasmacytom erfolgt zwischen den Bereichen des c-myc Protooncogens und eines der Immunoglobulingene und ist charakteristisch für den Tumor (LENOIR et al 1982, PERRY 1983, DYSON+RABBITTS 1985, CROCE 1987, CROCE+NOWELL 1985, GRAHAM+ADAMS 1986).

Ein Rearrangement des c-myc Protooncogens, bei dem eine Translokation nicht untersucht wurde, trat im Hepatom auf (MÖRÖY et al 1986).

Eine Amplifikation des c-myc Oncogens wurde beobachtet in:

- Neuroblastom (KINZLER et al 1986)
- Mammakarzinom (VIJVER et al 1987, MODJTAHEDI et al 1985)
- Darmkarzinom (ALITALO et al 1983, 1984a,b, YANDER et al 1985, LIN et al 1985)
- Kleinzelliges Lungenkarzinom (LITTLE et al 1983, MÄKELÄ+ALITALO 1986, WONG et al 1986)
- Akute myeloische Leukämie (ALITALO et al 1985)
- Magenkarzinom (SHIBUYA et al 1985)
- Glioblastom (TRENT et al 1986).

Mit der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob Genstrukturänderungen der Oncogene c-sis, c-mos und c-myc bei der Tumorprogression des murinen Osteosarkoms zu beobachten sind.

Da eine Amplifikation mit teilweisem Rearrangement des c-myc Oncogens in mehreren Tumoren vorliegt, wurde die Expression des Gens einer Analyse unterzogen.

Im ersten Abschnitt der Arbeit wird außerdem gezeigt, welcher Bereich des Chromosoms 15 - zusätzlich zum c-myc Oncogen - in den murinen Osteosarkomen amplifiziert ist.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit wird am Beispiel des Osteosarkoms der Transplantatlinie TV, das Rearrangement des amplifizierten myc Gens einer detaillierten Analyse unterzogen. Dafür werden zwei klonierte, rearrangierte myc Gene, einschließlich der 5' und 3' Nachbarsequenzen, kartiert.

Zusätzlich wird die Anordnung der klonierten Sequenzen im Genom der Tumoren untersucht.

2. MATERIAL

Mat.2.2. Zellkultur

PBS phosphatgepufferte Salzlösung pH 7,2

NaCl	0,82 %
KCl	0,04 %
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	0,17 %
KH ₂ PO ₄	0,03 %

0,05 % Trypsinlösung

0,05 % Trypsin 0,02 % EDTA in PBS pH 7,2 (Mat.2.2.)

Mat.2.3. DNA-Präparationen hochmolekularer DNA

Chloroform/Isoamylalkohol

Mischung V/V 24:1
Lagerung bei RT

Homogenisierungslösung DNA

10	mM	Tris-HCl pH 7,5-8
100	mM	NaCl
10	mM	EDTA pH 8
0,1	%	SDS
100	µg/ml	Proteinase K (MERK)

Phenol

Phenol (p.a. RIEDELdeHAEN) im Container schmelzen bei 68°C
ausschütteln (V/V 1:1) mit
1x A.dest
1x 1 M Tris-HCl pH 8
1x 0,1 M Tris-HCl pH 8
mit 0,1 M Tris-HCl pH 8 überschichten
in 100 ml-Aliquots lagern bei -20°C

RNaseA (SIGMA)

10 mg/ml RNaseA über Nacht lösen
in 10 mM Tris-HCl pH 7,5 15 mM NaCl 15 min kochen
auf RT abkühlen
Aliquots bei -20°C lagern
vor Benützung 1:10 in 1xTE (Mat.2.3.) verdünnen

50xTE pH 7,5

0,5 M Tris-Base
50 mM EDTA

1xTNE

10 mM Tris-HCl pH 7,5-8
100 mM NaCl
1 mM EDTA

Mat.2.4. Restriktionsenzym-Analyse

BPB Bromphenolblau-Ladepuffer I

80 % Glycerin
0,1 % BPB (MERK)

BPB Bromphenolblau-Ladepuffer II

4 M Harnstoff
50 % Sucrose
50 mM EDTA pH 8
0,25 % BPB

20xSSC pH 7,5

3 M NaCl
0,3 M Tri-Na-Citrat

10xTGA pH 8,1

0,4 M Tris-Base
0,2 M Na-Acetat
0,2 M EDTA

Mat.2.5. Hybridisierung

15xDehybridisierungspuffer

50 mM Tris-HCl pH 8
0,5 % SDS
2 mM EDTA
0,5 mM Na-Pyrophosphat

100xDenhardt's

2 % Ficoll (SIGMA)
2 % Polyvinylpyrrolidin (SIGMA)
2 % Bovines Serum Albumin (Fraktion V SIGMA)
bei +4°C lagern

Lachssperma (SIGMA Typ III)

10 mg/ml DNA in A.bidest bei RT lösen
nach Ultraschallbehandlung bei -20°C lagern
vor Benützung 1:1 mit TE (Mat.2.3.) verdünnen und 10 min kochen

Vorbehandlung des Biogels P-60 (BIORAD)

20 g in 50 ml TE (Mat.2.3.) aufnehmen
1 Tag quellen lassen
lagern bei +4°C

Mat.2.6. Präparative DNA-Fragment-Isolierung

Äquibrillieren des NACS 52-Säulenmaterials (BRL)

1 g Säulenmaterial in 10 ml 1 M NaCl in TE (Mat.2.3.) 1 h rühren
Pufferwechsel bis Überstand klar
über Nacht bei +4°C rühren

Matrix 1:1 mit 1 M NaCl in TE bei +4°C lagern

NET-Puffer

150 mM NaCl
20 mM Tris-HCl pH 8
0,2 mM EDTA pH 8

5xTBE

0,45 M Tris-Base
0,45 M Borsäure
10 mM EDTA pH 8

Vorbehandlung des Dialyseschlauches (BIOMOL)

10-20 cm lange Schläuche schneiden
3x10 min kochen in 2 % Na-Bicarbonat 1 mM EDTA
gründlich mit A.bidest spülen
10 min in A.bidest kochen
in sterilem A.bidest bei +4°C lagern

Mat.2.7. Angereicherte Genbank im EMBL3A

5xLigasepuffer

350 mM Tris-HCl pH 7,6
50 mM MgCl₂
bei -20°C lagern
für Versuch:
100 µl 5xLigasepuffer +
50 mM Dithiothreitol
2,5 mM rATP pH 7

TM-Puffer

50 mM Tris-HCl pH 7,8
10 mM MgSO₄

SM-Puffer

0,1 M NaCl
0,2 % MgSO₄
50 mM Tris-HCl pH 7,5
0,01 % Gelatine

5xStep-Puffer

0,5 % SDS
50 mM Tris-HCl pH 7,5
400 mM EDTA

Mat.2.9. Subklonierung

X-Gal/Amp-Platten

s.(Tab.Mat.2.7.) Platten

Plasmid-Homogenisierungslösung

8 % Sucrose
0.5 % Triton X-100
50 mM EDTA
50 mM Tris-HCl pH 8

Mat.2.10. Großpräparation von Plasmiden

Birnboim-Lösung I

50 mM α -D(+)-Glucose
10 mM EDTA pH 8
25 mM Tris-HCl pH 8

Birnboim-Lösung II

0,2 N NaOH
1 % SDS

Birnboim-Lösung III

24,48 g Na-Acetat pH 4,8
6,89 ml Eisessig
ad A.bidest 100 ml

Mat.2.11. RNA Slot-Blot und Northern-Blot

BPB Bromphenolblau-Ladepuffer III

50 % Glycerol
0,01 M Na-Phosphat pH 7,6
0,4 % BPB (MERK)

Cäsiumchlorid-Lösung

5,7 M CsCl
25 mM Na-Acetat pH 5
ad DEPC-A.bidest

DEPC Diethylpyrocarbonat-Behandlung

0,1 % DEPC (SIGMA) in entsprechende Lösung
kräftig schütteln
über Nacht stehen lassen
autoklavieren

Glyoxal-Vorbehandlung

8 ml Glyoxal (4,5 M; MERK) zu ca. 2 ml Ionenaustauscher
(BIORAD AG 501-X8)
2-3 min schütteln
Glyoxal absaugen
Vorgang 6-8x wiederholen bis pH >6
Aliquots bei -20°C

Glyoxilierungsmix

10 mM Na-Phosphat pH 7
1 M Glyoxal (Mat.2.11.)

50 % DMSO
ad DEPC-A.bidest

Lysispuffer RNA

4 M Guanidinium-Isothiocyanat (BRL)
25 mM Na-Citrat pH 7
0,1 M β -Mercaptoethanol
steril filtrieren
kurzzeitig bei -20°C lagern

Tab.Mat.2.7.: Verwendete Medien, Platten und Top-Agar in 2.7. und 2.9..

Medien	0,5 % NaCl ^a 1 % Trypton pH 7,4	Hefe ^c 0,5 %	Agar ^d	MgSO ₄ ^b 10 mM	Zusätze
TB	+	-	-	-	-
TBM	+	-	-	+	-
TBMM	+	-	-	+	0,2 % Maltose
LB	+	+	-	-	-
LBM	+	+	-	+	-

Platten

TBM	+	-	1,1 %	+	-
TB-Topagar	+	-	0,7 % ^e	+	-
LBM	+	+	1,1 %	+	-
X-Gal/Amp	+	+	1,1 %	-	30-50 μ g/ml Amp 0,004 % X-Gal ^f

^a Trypton (DIFCO) und NaCl in A.dest lösen, pH mit NaOH einstellen

^b nach Autoklavieren (< 55°C)

^c Hefe (BAG Lich) nach pH-Einstellung und autoklavieren

^d Agar (DIFCO) nach pH-Einstellung und autoklavieren

^e in Aliquots bei RT lagern, im Mikrowellenherd schmelzen, < 55°C MgSO₄

^f X-Gal in 1 ml Formamid lösen; Ampicillin-Stammlösung 25 mg/ml

Abkürzungen:

bp Basenpaar
cpm counts/min
h Stunde
kp Kilobasenpaare
min Minute
rpm revolutions/min
RT Raumtemperatur
s Sekunde
U Unit
Vol Volumen

2. Methoden

2.1. Primärtumoren OS, Primärtransplantate OTS, Transplantatlinien und Zelllinien

Die untersuchten murinen Osteosarkome stammten aus dem Institut der Pathologie in der GSF Neuherberg. Soweit sie nicht spontan auftraten, wurden sie durch intraperitoneale Injektion von osteotropen Radionukliden induziert (Tab.1, LUZ 1980, ERFLE et al 1979, 1981).

Fünf dieser Osteosarkome wurden als Transplantatlinien (Tab.1A) gehalten, wobei in jede Tumorgeneration (5 syngene Mäuse) 1-2 mm³ große Tumorstückchen mit einer Kanüle intramuskulär oder subcutan in den hinteren Unterschenkel transplantiert wurden. Die Tumoren wurden im Abstand von 3-4 Wochen auf neue Mäuse übertragen. TV-Tumoren aus verschiedenen Generationen wurden mit einer Nummer gekennzeichnet (z.B. TV386), wobei diese aber nicht mit der Generationszahl identisch war. Tumoren, die nicht getrennt nach Individuen eingefroren worden waren, erhielten die Bezeichnung des Tumors und die Nummer (z.B. TV209).

Die Osteosarkome OS2, OS5 und OS23 waren als permanente Zellkulturen angelegt (Tab.1B).

Die in Tab.1C verzeichneten Osteosarkome waren einmal in 4-10 NMRI-Mäuse transplantiert worden. Die resultierenden Primärtransplantate OTS eines Primärtumors erhielten die gleiche OTS-Nummer. Z.B. das Osteosarkom OS112 wuchs bei 2 Individuen nach der Transplantation an, dies führte zu den Primärtransplantaten OTS112/1 und OTS112/2.

Die verschiedenen TV-Tumoren einer Generation wurden analog gekennzeichnet, z.B. TV386/1 und TV386/2.

Alle Tumoren und Kontrollgewebe wurden sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Die Transplantationen und histologischen Untersuchungen der Osteosarkome wurden unter der Leitung von Dr. LUZ im Institut der Pathologie in der GSF Neuherberg durchgeführt.

A.

Transplantatlinien	Stamm ^a	Radionuklid ^b
TV	NMRI	²²⁴ Ra
TVC	C3Hx101 F ₁	²²⁴ Ra
TVK	NMRI	spontan
T-FBJ	C3H	FBJ-Sarkom-Virus
DOS	C3H	spontan ^c

B.

Zell-Linien	Stamm	Radionuklid
OS2	C3Hx101/F ₁	²²⁴ Ra
OS5	NMRI	²²⁴ Ra
OS23	NMRI	²²⁷ Th

C.

Primärtransplantate OTS (NMRI)	Radionuklide
OTS7	²²⁷ Ac ¹⁷⁷ Lu
OTS9	¹⁷⁷ Lu
OTS11	²²⁷ Ac ¹⁷⁷ Lu
OTS12	¹⁷⁷ Lu
OTS19	¹⁷⁷ Lu
OTS27	¹⁷⁷ Lu
OTS35	¹⁷⁷ Lu
OTS36	²²⁷ Ac
OTS37	¹⁷⁷ Lu
OTS50	¹⁷⁷ Lu
OTS95	²²⁴ Ra
OTS98	²²⁷ Th
OTS101	²²⁴ Ra
OTS107	²²⁴ Ra
OTS112	²²⁷ Th
OTS121	²²⁷ Th
OTS126	²²⁷ Th
OTS128	²²⁷ Th

^a Auszucht: NMRI, Inzucht: C3H und 101, F₁-Hybride: C3Hx101/F₁

^b Ac Actinium, Lu Lutetium, Ra Radium, Th Thorium

^c Etabliert von Th. Dunn, Nat. Cancer Inst., Bethesda USA

Tab.1: Radionuklid-induzierte, virus-induzierte und spontane Osteosarkome aus verschiedenen Mäusestämmen. A. Transplantatlinien, B. Zell-Linien, C. Primärtransplantate OTS.

2.2. Zellkultur

Zum Anlegen einer primären Zellkultur aus einem Osteosarkom wurde der Tumor aus dem Gewebe steril präpariert, zerkleinert und mit phosphatgepufferter Salzlösung PBS (Mat.2.2.) gewaschen. Die einzelnen Zellen wurden durch Trypsinierung gewonnen. Dazu wurden die Gewebstücke 3x20 min in 20 ml 0.05 % Trypsinlösung (Mat.2.2.) gerührt, die einzelnen Fraktion wurde zentrifugiert (800-1000 rpm, 10 min). Das Zellpellet wurde in 5 ml DULBECCO's Minimal Essential Medium DMEM (GIBCO; 0,85, 2,2 oder 3,7 g/l Na-Carbonat) + 20 % fötales Kälberserum FKS (GIBCO) vorsichtig aufgenommen und in 25 cm² FALCON-Kulturflaschen bei 5 % CO₂-Partialdruck inkubiert (37°C).

Der erste Mediumwechsel der Monolayer-Kulturen erfolgte nach 2-4 Tagen mit 5 ml DMEM + 10 % FKS. In die ersten drei Medien wurden Penicillin + Streptomycin (100 µg/ml, GIBCO) oder Gentamycin (100 µg/ml, SEBIO) zugegeben.

Für die Weiterführung der Zellkultur wurde die erste Passage bei Subkonfluenz der Zellen mit der Verdünnung 1:2 durchgeführt. Stärkere Verdünnungen wurden je nach Wachstumsgeschwindigkeit und Empfindlichkeit der Zellen gewählt, bei permanenten Kulturen (Zelllinien) maximal 1:20. Beim Passagieren wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS, DMEM + FKS entfernt. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch Inkubation mit 0,05 % Trypsinlösung (Mat.2.2.) (37°C, 10 min). Nach Abklopfen der Zellen wurde die Trypsinreaktion mit DMEM oder PBS gestoppt, die entsprechend verdünnte Zellsuspension wieder mit frischem DMEM + 10 % FKS inkubiert (37°C). Je nach Bedarf wurden 75 cm² FALCON- und 150 cm² COSTAR-Flaschen benutzt.

Die Zellkulturen wurden in 2-wöchigem Abstand auf Mykoplasmeninfektion untersucht (SCHMIDT+ERFLE 1984). Infizierte Zellkulturen wurden im 3-Tage-Rhythmus abwechselnd mit 10 µg/ml Tiamutin und 5 µg/ml Minocyclin (beide TAD Pharma. Werk) behandelt.

2.3. DNA-Präparation hochmolekularer DNA

DNA-Präparationen wurden aus Tumoren oder aus Zellpellets gewonnen. Bei Präparationen aus Geweben wurden gefrorene Stücke von 0,15-0,4 g abgeschlagen. Zellpellets (5×10^7 - 1×10^8 Zellen) wurden in tiefgefrorenem Zustand aus dem Plastikröhrchen herausgebrochen. Für den Zellaufschluß im BRAUN-Mikro-Dismembrator wurden BRAUN-Teflonkapseln, inklusive Deckel und einer Stahlkugel, in flüssigem Stickstoff vorgekühlt, verwendet. Für das Pulverisieren des Pellets waren 20-25 s ausreichend, für knochenreiches Gewebe waren 30-40 s notwendig.

Nach Entfernen der Stahlkugel wurde das Pulver mit 8 ml frischer Homogenisierungslösung (Mat.2.3.) in Polypropylen-Schwarzkappenröhrchen (DU PONT. 50 ml) gegeben und vorsichtig verteilt. Das Gewebe wurde 1-2 h bei 50°C. dann über Nacht bei 37°C inkubiert.

Bei der DNA-Isolierung wurden silikonisierte Glaspasteurpipetten mit großer Öffnung benützt. Die DNA-Lösung wurde bei zu großer Viskosität mit 1xTNE-Puffer (Mat.2.3.) verdünnt. Der größte Anteil der Proteine wurde mit der 1. Extraktion mit Phenol:Chloroform/Isoamylalkohol = 1:1 (Mat.2.3.) aus der wäßrigen DNA-Lösung entfernt (MANIATIS et al 1982). Das Verhältnis DNA-Lösung : Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol betrug 1:1. Die Mischung wurde auf einem Rad rotiert (20 rpm, 5 min), anschließend im Ausschwingrotor zentrifugiert (10000 rpm, 10 min). Die DNA in der wässrigen Phase (oben) wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgehoben. Das Phenolisieren wurde je nach Verunreinigung der DNA-Lösung 2-3x durchgeführt. Anschließend wurde 2-3x mit Chloroform/Isoamylalkohol (Mat.2.3.) extrahiert, um Phenolreste zu entfernen. Chloroform-Isoamylalkohol-Reste wurden 1-2x mit wassergesättigtem Diethylether "ausgeschüttelt".

Vor der Ethanol-fällung der hochmolekularen DNA wurde der Ether (obere Phase) abgesaugt. Die DNA-Lösung wurde in einen 100 ml-Erlenmeyer-Kolben mit 0,3 M Na-Acetat pH 5,2 und 2,5 Vol absolutem

Ethanol (20 ml) gegeben und vorsichtig bei RT geschwenkt. Das glasige Präzipitat wurde sofort mit einem Glasstab gefischt und kurz in 70 % Ethanol gewaschen. Danach wurde die DNA in 2 ml 1xTE (Mat.2.3.) gelöst (50°C, 10 min-2 h; eventuell über Nacht bei RT).

Die **Degradierung der RNA** wurde durch die Inkubation mit RNaseA (Mat.2.3.) (37°C, 30-60 min) erreicht. Durch anschließende Zugabe von 100 µg/ml Proteinase K (MERK, 37°C, 30-60 min), wurde die RNaseA degradiert. Die Extraktion der Proteinase K erfolgte wieder durch zweimalige Behandlung mit Phenol, Chloroform/Isoamylalkohol und Ether. Nach der 2. Ethanolfällung wurde die DNA in 2-3 ml 1xTE aufgenommen und gelöst.

Die **Dialyse der DNA-Lösung** wurde in Ultrahülsen (SCHLEICHER+ SCHUELL, UH 100/25) in 1 l TE/1 ml DNA durchgeführt (über Nacht, + 4°C). Mit der Druckdialyse in einem Ultrahülsengerät (SCHLEICHER+SCHUELL, UH 100/1) wurde die DNA-Lösung auf ca. 1 ml eingengt. Die DNA wurde bei -70°C oder + 4°C gelagert. Die Fragmentlängen der so präparierten hochmolekularen DNA betrug ungefähr 300-400 kb.

Die **Konzentrationsbestimmung** der DNA erfolgte mit dem GILFORD-Photometer bei der optischen Dichte OD 260 nm, wobei 1 OD 50 µg/ml DNA entspricht (MANIATIS et al 1982). Außerdem wurden sogenannte Tüpfelplatten verwendet (MANIATIS et al 1982).

2.4. Restriktionsenzym-Analyse

Die gereinigte DNA wurde mit **Restriktionsendonukleasen Typ II** (AMERSHAM, BIOLABS, BOEHRINGER, BRL) in definierte Fragmente geschnitten (ROBERTS 1982, MANIATIS et al 1982). Um mit Sicherheit vollständige Enzymverdaus der DNA zu erhalten, wurden 3-5 U/µg DNA genommen.

Bei Verdaus mit mehreren Enzymen, wurden diese gleichzeitig oder hintereinander eingesetzt. Einzelne Firmen (AMERSHAM) geben für ihre Endonukleasen den Prozentsatz der Aktivität bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen an. Es wurde ein gleichzeitiger Verdau durchgeführt,

wenn sich die Pufferbereiche der Enzyme überschneiden. Bei unterschiedlichen Bedingungen wurde die Salzkonzentration für das zweite Enzym mit NaCl angeglichen. Die Reaktion wurde durch Erhitzen gestoppt (65°C, 10 min). Anschließend erfolgte die Zugabe von 1/10 Vol Bromphenolblau-Ladepuffer I oder II (BPB, Mat.2.4.)

Mit der horizontalen Gel-Elektrophorese wurden die enzymspezifischen Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Dafür wurden 3 verschiedene Standardformen zum Gießen der Gele und ihre entsprechenden Lauf-Apparaturen (BRL) verwendet. Für das Großgel (H4, 400 ml) wurden 10-20 µg hochmolekularer DNA/Tasche eingesetzt, für das Minigel (H5, 100 ml) 2,5-5 µg und für das Babygel (H6, 20 ml) 0,5-1 µg. Analytische Gele wurden aus 0,8-1,0 % SEAKEM-Agarose im 1xTGA (Mat.2.4.) gegossen. Damit wurde eine ausreichende Auftrennung der Fragmente von 0,4-10 kb erreicht (MANIATIS et al 1982). Durch Zugabe von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (1 mg/ml, SHARP et al 1973) in das Gel oder den Laufpuffer (1xTGA) wurden DNA-Banden von 20-50 ng sichtbar gemacht. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurden die beiden äußeren Taschen eines Gels mit dem Längenstandard LS II oder III besetzt (BOEHRINGER, 0,2-0,5 µg/Tasche, II: λ geschnitten mit HindIII, III: EcoRI+HindIII).

Das Ethidiumbromid-gefärbte Gel wurde auf einer UV-Platte (TRANSILLUMINATOR. ULTRA-VIOLET products, inc.; 302 oder 365 nm) fotografiert (KODAK Nr.23A-Rotfilter, POLAROID-Film Nr. 665).

Mit der Southern-Blot-Methode (SOUTHERN 1975, MANIATIS et al 1982) wurde bei analytischen Gelen die denaturierte DNA auf ein Nitrozellulose-Filter NC (SCHLEICHER+SCHUELL BA 85, 0,45 µm Porengröße) übertragen. Um den Transfer großer DNA-Fragmente zu erleichtern, wurden durch 0,25 N HCL Strangbrüche induziert (15 min, WAHL et al 1979). Darauf folgte die Denaturierung mit 0,2 N NaOH + 0,6 M NaCl (1 h), neutralisiert wurde mit 1 M Tris-HCl pH 7,6 + 0,6 M NaCl (1 h). Das Filter wurde mit A.bidest benetzt und mindestens 5 min in 20xSSC

(Mat.2.4.) äquilbrilliert. Mit 3MM-Chr-WHATMAN-Papier, Kleenex-Papierstapel und 20xSSC wurden die DNA-Fragmente mittels Kapillareffekt vom Gel zum darauffolgenden Filter transportiert. Der genaue Aufbau des Southernblots ist in SOUTHERN (1975) und MANIATIS et al (1982) beschrieben. Das Filter wurde über Nacht geblottet. Die denaturierte DNA wurde durch Backen des Filters fixiert (80°C, 2 h). Dieses wurde anschließend in eine Hybridisierungs-Plastikhülle (KARMAN+DROLL) eingeschweißt und bei RT aufbewahrt, oder sofort für die Hybridisierung verwendet.

2.5. Hybridisierung von NC-Filtern und Biodyne-Membranen

Für die Hybridisierung wurden DNA-Proben mit (α -³²P)dCTP (spez. Aktivität 3000 Ci/mmol bei 10 mCi/ml, AMERSHAM) radioaktiv markiert. Bei der ³²P-Nick-Translation (Kelly et al 1970) wurde der Kit für das Standardprotokoll von AMERSHAM benützt. Für die spez. Aktivität von $1-2 \times 10^8$ cpm pro 1 µg DNA wurden 20 µl (α -³²P)dCTP, 20 µl Solution 1 und 10 µl Solution 2 für einen Gesamtansatz von 100 µl verwendet (15°C, 1-2 h). Solution 1 des Kits enthält die nicht markierten Nukleotide dATP, dGTP und dTTP (100 µM) in 5-fach konzentriertem Nick-Translationspuffer, Solution 2 in 10 µl 5 Einheiten DNA-Polymerase I und 100 pg DNaseI. Die Reaktion wurde mit 5 µl 0,5 M Ethylendiamintetraessigsäure EDTA gestoppt.

Die Isolierung der ³²P-markierten DNA-Fragmente erfolgte durch die Abtrennung der Nukleotide mit einer Polyacrylamid-Säule (5 ml vorbehandeltes BIORAD Biogel P-60, Mat.2.5.). Der gesamte Nick-Translationsansatz wurde in 100-200 µl TE aufgenommen und auf das Biogel gegeben. Nach dem Spülen mit TE wurden 10 0,4-0,5 ml-Fractionen abgenommen. Pro Fraktion wurden 5 µl-Aliquots nach CERENKOV (MANIATIS et al 1982) in Szintillationsröhrchen gemessen (³H-Kanal, 0,2 min). Vom gepoolten 1. Peak, der die markierten DNA-Fragmente enthielt, wurde ein 5 µl-Aliquot in 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Aquasol-2, NEN, ³²P-

Kanal, 1 min) gemessen und daraus die cpm/ml errechnet. Die nicktranslatierte DNA-Probe wurde entweder bei +4°C gelagert oder sofort für die Hybridisierung des NC-Filters (2.4.) oder der Biotin-Membran (2.11.) verwendet.

Bei der **Hybridisierung** bildeten die einzelsträngigen, fixierten DNA- oder RNA-Moleküle (Filter oder Membran) mit der nicktranslatierten DNA-Probe ein doppelsträngiges Hybridmolekül, entsprechend ihrer Homologie. Die Bedingungen der Vorhybridisierung, der Hybridisierung und des Waschens wurden entsprechend der Homologie gewählt. Für die Berechnung der Stringenz, d.h. dem Prozentsatz an homologen Basenpaarungen zwischen fixiertem DNA-Einzelstrang und Proben-DNA-Einzelstrang, wurden die Gleichungen nach MARMOR+DOTY (1962), McCONAUGHY et al (1969), HOWLEY et al (1979), WETMUR+DAVIDSON (1968) und HYMAN et al (1973) verwendet.

Tab.2A zeigt die nach den Gleichungen berechneten Homologien zwischen DNA-DNA für die Hybridisierungs- und Waschbedingungen bei hoher und niedriger Stringenz. Um den radioaktiven Hintergrund zu erniedrigen, wurde die Stringenz des Waschschrittes 3 größer als die der Hybridisierung gewählt. Tab.2B zeigt den gesamten Versuchsansatz für DNA-DNA (Träger: NC-Filter) bei hoher und niedriger Stringenz, Tab.3 für RNA-DNA (Träger: Biotin-Filter). Durch die Vorhybridisierung wurden unspezifische Bindungsstellen geblockt (Mat.2.5. Lachssperma, Denhardt's-Lösung). Für die Vorhybridisierung wurden 0,1 ml Lösung/cm², für die Hybridisierung 0,025 ml/cm² eingesetzt (Tab.2B, 3). Der Hybridisierungslösung wurde die nicktranslatierte DNA-Probe zugesetzt, die vorher denaturiert worden war (95°C, 10 min). Für die radioaktive Markierung eines *single-copy*-Gens der hochmolekularen DNA wurden 1-4x10⁶ cpm/ml Hybridisierungslösung eingesetzt, bei amplifiziertem Gen oder klonierter DNA ein Zehntel davon. Bei RNA wurden 2x10⁶ cpm/ml nicht überschritten. Bei analytischen Gelen (DNA 2.4. oder RNA 2.11.) wurde

der Längenstandard LS mit ^{32}P -markiertem LS versetzt (8×10^3 cpm/Tasche und Transfer).

Auf die Hybridisierung folgten die Waschschrte 1, 2 und 3 (Tab.2B oder 3).

A.

Stringenz	I		II	
	Hybridisierung		Waschschritt 3	
	Bedingungen	Homologie	Bedingungen	Homologie
hoch	42°C 50% FA ^a 5x SSC	84%	65°C 0,1x SSC	95%
niedrig	35°C 40% FA 6x SSC	73%	65°C 1x SSC	83%

B.

Lösungen	Vorhybrid.	Hybrid.	Waschschrte		
			1	2	3
Dauer	2-20 h	20 h	1x 30	3x 5	30-180 min
Temperatur	Tab.2A,I	Tab.2A,I	RT	RT	Tab.2A,II
SSC-Gehalt			2x SSC	2x SSC	
Formamid			-	-	-
Denhardt's	5x ★	5x ★	0,5x ★	-	-
Na-Phosphat-	0,05 M	0,02 M	-	-	-
Puffer pH 6,5					
denat. Lachs-	0,25 mg/ml ★	0,05 mg/ml ★	-	-	-
sperma					
Glycin	1 % ★	-	-	-	-
SDS	-	-	-	0,1 %	0,1 %

★

durch Magermilch ersetzt

0,7 % 0,7 % 0,25 % - -

^a Formamid

Tab.2: A. I+II Versuchsbedingungen und errechnete Homologien für Hybridisierung und Waschschritt 3 bei hoher und niedriger Stringenz von DNA-DNA-Strängen. B. Gesamter Versuchsansatz für Nitrozellulose-Filter.

Lösungen	Vorhybrid.	Hybrid.	Waschschritte	
			1	2
Dauer	3-20 h	20 h	3 x 5	2 x 20 min
Temperatur	42°C	42°C	RT	50°C
SSC-Gehalt	5 x	5 x	2 x	0,1 x
Formamid	50 %	50 %	-	-
Denhardt's	5 x	5 x	-	-
Na-Phosphat-Puffer pH 6,5	50 mM	50 mM	-	-
denat. Lachs-sperma	0,25 mg/ml	0,25 mg/ml	-	-
SDS	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %

ad DEPC-A.bidest. (Mat.2.11.)

Tab.3: Stringente Vorhybridisierungs- und Hybridisierungs-Bedingungen, sowie Waschschritte für RNA-DNA-Stränge bei Verwendung von Bidyne-Membranen.

NC-Filter und Bidyne-Membranen wurden zum Teil mehrfach hybridisiert. Die vorherige Hybridisierungsprobe wurde durch eine Dehybridisierung eluiert. Die Stammlösung des Puffers für NC-Filter (Mat.2.5.) war 15x konzentriert und wurde 1x verwendet (65°C, 2-4 h).

Die Membran wurde zur Dehybridisierung in 50 % Formamid + 0,01 M Na-Phosphat pH 6.5 in einen Hybridisierungsbeutel eingeschweißt und bewegt (65°C, 1,5 h), danach in 2xSSC + 0,1 % SDS geschwenkt (RT, 0,5 h).

Vor der Autoradiographie wurde das NC-Filter luftgetrocknet, die Bidyne-Membran feucht, in Folie eingeschweißt und dann zwischen 2 DL PONT-Verstärkerfolien in einer AGFA-Röntgenfilmkassette exponiert (-70°C). Als Film wurde KODAK Diagnostic Film X-Omat AR verwendet. Die Expositionszeit richtete sich nach der Anzahl der Genkopien/Genom und der Homologie der DNA-Proben.

NC-Filter oder Bidyne-Membranen wurden mit unterschiedlichen DNA-Proben (Tab.4) hybridisiert. Für NC-Filter (DNA) wurden bei murinen Proben hoch-stringente Bedingungen, bei weniger homologen Proben (Virus,

Mensch, Ratte) niedrig-stringente gewählt (Tab.2A). RNA, gebunden an die Biotin-Membran, wurde nur stringent hybridisiert (Tab.3). Bei den Hybridisierungen wurde größtenteils das isolierte DNA-Insert verwendet. Dafür wurde nach einer Großpräparation des rekombinierten Vektors (Plasmid 2.10., rc-myc Klone 2.8.), das Insert durch Restriktionsenzymverdau herausgeschnitten und in der präparativen Gelelektrophorese abgetrennt, isoliert und gereinigt.

Bezeichnung	DNA-Insert	Restriktionsenzyme Fragmentgröße	Herkunft	Literatur
pSVc-myc 1	c-myc ab 2. Exon, 3. Exon und 3' Sequenz	XbaI-BamHI 4,8 kb	Maus	LAND 1983
U157/11	c-myc 3. Exon	ClaI-EcoRI 1.4 kb	Mensch	HARTL+LIPP 1987
S421/1	c-myc 1. Exon	PvuII-PvuII 0,9 kb	Mensch	LIPP 1987
Klon 11	rc-myc Typ I	EcoRI-EcoRI 19,6 kb	Maus TV389/1	4.2.
Klon 10	rc-myc Typ II	EcoRI-EcoRI 20,2 kb	Maus TV389/1	4.2.
pTS25E/P	Mlvi-1	EcoRI-PstI 1,3 kb	Ratte	TSICHLIS 1983, 1985
pTS26P/P	Mlvi-1	PstI-PstI 0,6 kb	Ratte	TSICHLIS 1983 KOZAK 1985
pTS10	Mlvi-2	HindIII-HindIII 1,8 kb	Ratte	TSICHLIS 1984 1985
p λ Hac-69A	Actin	HindIII-HindIII 3,4 kb	Mensch	MOOS+GALLWITZ 1983
pC60	v-sis	PstI-XbaI 0,9 kb	Virus	GELMAN 1981
p-src	v-mos	XbaI-HindIII 1,2 kb	Virus	van BEVEREN 1981

Tab.4: DNA-Proben, die für die Hybridisierung von hochmolekularer DNA und RNA verwendet wurden.

Für die Bestimmung der Fragmentgrößen wurden die Autoradiographien, und bei den Klonen und Subklonen zusätzlich die Gelfotos verwendet. Bei der Gelelektrophorese wandern die DNA-Moleküle umgekehrt proportional zum $\log_{10}$ ihres Molekulargewichtes (HELLING et al 1974). Für ein Gel oder eine Autoradiographie wurde jeweils eine "Eichkurve" der Längenstandard-Fragmente aufgestellt und die Größe eines bestimmten Restriktionsenzymfragments abgelesen. Im Gel-Foto konnten Banden bis ca. 0,4 kb erkannt werden. Die Messung war im Größenbereich 0,5-8 kb genau, wurde aber mit zunehmender Länge der Fragmente schlechter, vor allem über 15 kb. Doppel- bzw. Dreifachbanden unter 1,0 kb ließen sich nur schwer von Einzelbanden unterscheiden.

Für die Bestimmung des Amplifikationsgrads der enzymspezifischen DNA-Fragmente eines Gens, wurden Autoradiographien mit unterschiedlich langen Expositionszeiten benützt. Nach der Hybridisierung mit der DNA-Probe wurde die Expositionszeit bestimmt, bei der das Signal für das normale Fragment der NMRI Kontroll-DNA sichtbar wurde. Dann wurde für das normale Fragment des Tumors der Zeitpunkt festgelegt, bei dem dessen Signal dieselbe oder die doppelte Stärke A aufwies. Für den Wert A des Tumors wurde bei kürzerer Expositionszeit der Zeitfaktor berücksichtigt. Z.B gilt für den Tumor mit $A=1$ und der Expositionszeit von 4 h, und $A=1$ bei der Kontrolle mit der Expositionszeit 20 h, daß der Wert A des Tumors mit dem Faktor 5 multipliziert wurde. Das heißt, das Signal für das Restriktionsenzymfragment des Tumors war für die entsprechende Hybridisierungsprobe ungefähr 5-fach verstärkt.

Bei einem rearrangierten Fragment des Tumors wurde als Vergleich, das normale Fragment der Kontroll-DNA benützt, das im gleichen Größenbereich lag.

Für die Bestimmung wurden zusätzlich Unterschiede in den DNA-Mengen berücksichtigt. Dazu wurde das Gel-Foto, oder die Autoradiographie der

Hybridisierung mit der v-mos Probe (p-src, Tab.4) benützt. Für die Bestimmung des Amplifikationsgrads wurde außerdem ein Vergleich der DNA-Verdünnungsreihen des Tumors und der Kontrolle durchgeführt.

2.6. Präparative DNA-Fragment-Isolierung

In der präparativen Gel-Elektrophorese wurden enzymspezifische DNA-Fragmente aufgetrennt und isoliert. Dafür wurde das Großgel und dessen horizontaler Lauf-Apparat (2.4.) verwendet. Die Agarosekonzentration richtete sich nach der Größe des zu isolierenden DNA-Fragments (MANIATIS et al 1982), ebenso der Längenstandard. Wurde das isolierte DNA-Fragment für die Klonierung verwendet, wurde kein Ethidiumbromid benützt (2.7.). Nach Abschluß der Elektrophorese wurde das zu isolierende DNA-Fragment, dessen Position mit dem Längenstandard bestimmt wurde, auf einer UV-Platte herausgeschnitten.

Für die Elektro-Elution der DNA aus dem Gelstreifen wurden 2 Methoden benützt, 1. der Dialyseschlauch (McDONNELL et al 1977) und 2. der Biotrap-Apparat (SCHLEICHER+SCHUELL).

Bei der 1. Methode (MANIATIS et al 1982) wurde der Gelstreifen in 0,5xTBE (Mat.2.6.) in einem vorbehandelten Dialyseschlauch (Mat.2.6.) plaziert. Die Elution der DNA erfolgte in 0,5xTBE im Elektrophoresegerät (100 V, 2-3 h). Um die DNA von der Wand des Dialyseschlauches abzulösen, wurde für 2 min bei der gleichen Spannung umgepolt. Die DNA-Lösung wurde abgesaugt und die Konzentration bestimmt.

Bei der 2. Methode wurde die Biotrap-Apparatur benützt, die mit dem ausgeschnittenen Gelstreifen beladen wurde. Das Gerät wurde in die Elektrophoresewanne eingesetzt, die Elektroelution erfolgte in 0,5xTBE bei 200 V (0,5-4 h). Beide äußeren Seiten des Biotrap-Apparates waren mit einer Zellulose-Membran BT1 besetzt, die den Pufferionendurchfluß nicht behinderte, jedoch den Ein- und Austritt großer Moleküle. Die Zellulose-Membran des Typs BT2, die zwischen Elutionskammer (Gelstreifen) und DNA-Falle eingespannt wurde, diente als Vorfilter und

verhinderte das Nachströmen des Puffers. Durch das Umpolen der Spannung (15-20 s) wurden die DNA-Moleküle von der BT1-Membran entfernt. Die DNA-Lösung wurde mit einer Eppendorfspitze aus der DNA-Falle entnommen. Die Ausbeute der eingesetzten DNA betrug ungefähr 90 %.

An die Elektroelution schloß sich die **Reinigung der DNA-Fragmente an**. Für die Reinigung wurden NACS 52-Säulen verwendet. Das Säulenmaterial (NACS 52 Resin, BRL) wurde vor der Verwendung äquibriilliert (Mat.2.6.), anschließend in die ECONO-Säulenhülle (BIORAD) gefüllt (0,3 ml für 10 µg DNA). Bei Verwendung der Säulenhülle von BRL, die inklusive Säulenmaterialfüllung geliefert wird (Bindungskapazität 40 µg DNA), wurde die Matrix in der Säule hydriert (3x2,0 M NaCl in TE) und äquibriilliert (NET-Puffer Mat.2.6.).

Die folgenden Schritte unterschieden sich nicht, wenn doppelsträngige DNA größer 1 kb gereinigt wurde. Die Säule wurde 3x mit der DNA-Lösung geladen, anschließend 3x mit 1 ml 0,5 M NaCl in TE gewaschen. Von dem trockengelaufenen Säulenmaterial wurde die DNA mit hoher Salzkonzentration elulert (0,5 ml 2,0 M NaCl in TE). Die DNA-Konzentrationen der 5x100 µl-Fraktionen wurden mit der Tüpfelplatte bestimmt, entsprechend gepoolt, dann 1:1 mit TE (Mat.2.3.) verdünnt und mit Ethanol gefällt.

Die **Ethanolfällung isolierter DNA-Fragmente** erfolgte in einem Eppendorfgefäß. Zur DNA-Lösung wurden 0,3 M Na-Acetat pH 5,2 und 2,5 Vol absolutem Ethanol oder 1 Vol Isopropanol gegeben. Nach Inkubation (-20°C, 10 min- über Nacht) wurde zentrifugiert (Ausschwingrotor, 10000 rpm, 0,5-1 h), danach mit 70 % Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert (10 min). Das DNA-Pellet wurde im Speed Vac Concentrator (SAVANT, 5-10 min) im Vakuum getrocknet, anschließend im entsprechenden TE-Volumen aufgenommen und bei +4°C oder -70°C gelagert.

2.7. Konstruktion der angereicherten Genbank des Osteosarkoms TV im EMBL3A-Phagen

Für die Klonierung des c-myc Oncogens wurde eine angereicherte Genbank (TILGHMAN et al 1977, TONEGAWA et al 1977, EDGELL et al 1979) des murinen Osteosarkoms TV (Tab.1A) im λ -Bakteriophagen EMBL3A (FRISCHAUF et al 1983, LAMBDA II 1983) erstellt.

Im Substitutionsvektor EMBL3A kann das zentrale Drittel des Genoms durch ein "fremdes" DNA-Insert ersetzt werden (CAMBPELL 1971, MANIATIS et al 1982, WINNACKER 1984). Für die Klonierung des c-myc Oncogens wurde von der DNA-Präparation des Tumors TV389/1 ausgegangen. Um das gesamte c-myc Gen und dessen benachbarten Sequenzen zu erhalten, wurde der DNA-Abschnitt EcoRI-EcoRI kloniert, da EcoRI nicht im Gen schneidet (Abb.3A, 18). Zur Herstellung der angereicherten Genbank wurde die DNA des Tumors mit EcoRI komplett verdaut. Isoliert wurde die DNA aus der Region des 20 kb EcoRI/EcoRI-Fragments (E/E), das mit den DNA-Proben pSVc-myc 1 und S421/1 (Tab.4) positiv hybridisierte (Abb.4I,III).

Das Fragment wurde gereinigt und mit den isolierten Armen des EMBL3A-Phagen rekombiniert. Nach der in vitro-Verpackung des Bakteriophagen (HOHN+MURRAY 1977, STERNBERG et al 1977) und der Infektion des Wirtsbakteriums LE392 (MANIATIS et al 1982), erfolgte das Screening, wobei mit der Hybridisierungsprobe pSVc-myc 1 nach den positiven Klonen gesucht wurde. Diese wurden nach der Identifizierung isoliert und die DNA präpariert.

Für die Präparation der 20 kb E/E-Fragmente des Tumors TV389/1 wurden 250 μ g hochmolekularer DNA mit dem Restriktionsenzym EcoRI (nukleasefrei 2.7., 5 U/ μ g DNA, BOEHRINGER) komplett verdaut (37°C, 3 h). Für die präparative Gel-Elektrophorese wurde kein Ethidiumbromid verwendet, um Mutationen der zu klonierenden DNA-Fragmente durch den interkalierenden Farbstoff zu verhindern. Nach der Elektrophorese wurden der Längenstandard auf beiden Seiten des Gels abgeschnitten und die

Gelstreifen mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) gefärbt. Nach Anlegen des nun fluoreszierenden Längenstandards an das präparative Gel, wurde ein 1 cm breiter Streifen (Schnitt ca. 0,5 cm über und unter dem 23,6 kb-Standard) unter UV-Kontrolle herausgeschnitten. Die Elektroelution der ca. 18-30 kb großen isolierten DNA-Fragmente erfolgte im Dialyseschlauch, gereinigt wurde die DNA mit der NACS-Säule. Nach der Ethanolfällung wurde die Gesamtkonzentration bestimmt, die DNA bei -20°C gelagert.

Die Klonierung des murinen c-myc Oncogens wurde im EMBL3A-Phagen durchgeführt. Die Klonierungskapazität beträgt 9-27 kb, die Verpackungskapazität 77-105 % des Genoms von 42,3 kb. Als Wirtsbakterium für die Amber-Mutante wurde LE392 (MANIATIS et al 1982) benutzt, ein Suppressor F-positiver E.coli-Stamm. Damit wurden die "Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch in-vitro neukombinierte Nukleinsäuren" (Bundesministerium für Forschung und Technologie) eingehalten.

Der EMBL3A-Phagen besitzt am 5' und 3' Ende des Stufferfragments jeweils einen Polylinker, eine multiple Erkennungsstelle für Restriktionsendonukleasen, die in den Armen des EMBL3A nicht schneiden (MANIATIS et al 1982, WINNACKER 1984). Zu diesen Enzymen gehört das "Klonierungsenzym" EcoRI.

Für die Isolierung des EMBL3A-Phagen wurde eine frische Vorkultur (Übernachtskultur) mit einem Inokulum eingefrorener LE392 Bakterien (-20°C in 25 % Glycerin) angesetzt (10 ml TB-Medium Tab.Mat.2.7., 32°C). Nach Zentrifugation (2000 rpm, 10 min) wurden die Zellen in 4 ml 0,01 M MgSO₄ resuspendiert und bei +4°C gelagert.

Die Infektion der Übernachtskultur erfolgte mit 100 µl EMBL3A-Phagenstock (ca. 10¹⁰ pfu/ml) im Schüttler (200 rpm, 32°C, 20 min). Für die Hauptkultur wurden je 2,5 ml der infizierten LE392 Bakterien zu 200 ml vorgewärmtem LBM-Medium (Tab.Mat.2.7.) pipettiert und geschüttelt (200 rpm, exakt 39°C). Die Lyse der Bakterien trat nach 9 h ein.

Die Reinigung des EMBL3A-Phagen erfolgte nach YAMAMOTO et al (1970), modifiziert von VANDE WOUDE et al (1979, MANIATIS et al 1982). Das gepoolte Lysat wurde in einem 2 l-Kolben mit 1 M NaCl bis zur Auflösung des Salzes geschüttelt. Nach der Zugabe von 0,1 ml Chloroform/100 ml wurde nochmals kräftig geschwenkt.

Nach Absetzen des Chloroforms wurde das Lysat zentrifugiert (SORVALL 6000 rpm, 15 min, +4°C). Aus dem klaren Überstand wurden die intakten Phagenpartikel mit 10 % Polyethylenglycol PEG-6000 (ROTH) präzipitiert, wobei der Ansatz im 2 l-Kolben bis zur Auflösung des PEG geschwenkt wurde (5-10 min). Die Lösung wurde inkubiert (Eiswasser, 1 h) und anschließend zentrifugiert (6000 rpm, 10 min, +4°C). Das Phagenpellet wurde in 4 ml TM-Puffer (Mat.2.7.) aufgelöst. Durch Zugabe von 4 ml Chloroform (Vortex 30 s) und Zentrifugation (4000 rpm, 10 min), wurde das PEG präzipitiert. Die obere Phase, die die intakten Phagen im TM-Puffer enthielt, wurde mit einer Pasteurpipette abgehoben.

Anschließend wurde ein Glycerol-Stufengradient ausgeführt. In ein SW41-Röhrchen (BECKMAN) wurden langsam 3 ml 40 % Glycerol in TM, 4 ml 5 % Glycerol in TM und die Bakteriophagensuspension eingefüllt. In der Ultrazentrifuge (35000 rpm, 60 min, +4°C) wurden die Phagenpartikel pelletiert, anschließend in 1 ml TM resuspendiert. Reste von bakterieller DNA und RNA wurden mit DNaseI (1 µg/ml) und RNaseA (100 µg/ml) (Mat.2.3.) entfernt (30 min, 37°C). Durch Behandlung mit Proteinase K (100 µg/ml) wurden DNaseI und RNaseA degradiert, durch den 5xStep-Puffer (Mat.2.7.) die Phagenpartikel aufgebrochen (50°C, 15-60 min).

Mit Phenol (Mat.2.3.) (1:1) wurden Proteinase K und andere Proteine extrahiert. Anschließend erfolgte eine Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Mat.2.3.) und mit Chloroform/Butanol (80 % / 20 %) im Verhältnis 1:1. Nach der Zentrifugation wurde die wäßrige Phase abgehoben und die DNA mit Ethanol gefällt. Die gefischte

Phagen-DNA wurde in 1 ml TE gelöst, anschließend dialysiert. Nach der Druckdialyse erfolgte die Konzentrationsbestimmung der Phagen-DNA (ca. 50 µg DNA).

Für die **Präparation der EMBL3A-Arme** (MANIATIS et al 1982) wurden 44 µg der Phagen-DNA mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut (nukleasefrei 2.7., 5 U/µg DNA, 3 h, 37°C, BOEHRINGER). Um die anschließende Isolierung der Arme aus dem Agarosegel (0,7 %, ohne Ethidiumbromid 2.7.) zu erleichtern, wurden sie über die *cos*-sites verklebt. Das "Verkleben" erfolgte in 0,5 M NaCl (42°C, 3 h).

Die Isolierung der verklebten Arme des Phagen (ca. 30 kb) aus dem Gel erfolgte nach 2.6.. Die Elektroelution der DNA aus dem Gelstreifen wurde im Dialyseschlauch, die Reinigung mit der NACS-Säule durchgeführt. Nach der Ethanolfällung wurde die DNA zentrifugiert (Ausschwingrotor, 40000 rpm, 20 min). Das getrocknete Pellet wurde in TE aufgelöst, die Konzentration mit der Tüpfelplatte bestimmt. Die DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

Für die **Ligierung** der λ-Arme mit dem fremden DNA-Insert, wurden das molare Verhältnis λ-Arme : DNA-Insert und deren absolute Konzentrationen beachtet (MANIATIS et al 1982, WINNACKER 1984). Für die in vitro-Verpackung der rekombinierten Phagen-DNA ist die Bildung von Konkatemeren wichtig. Für eine optimale Ausbeute an Konkatemeren, sollten äquimolare Konzentrationen der Enzymschnittstellen (Enden j) vorliegen. Die absoluten DNA-Konzentrationen der Enden j müssen so groß sein, daß die Wahrscheinlichkeit der Ligierung von Insert und Armen (intermolekular, Konkatemere) größer ist, als die Selbstligierung der Fragmente (intramolekular, zirkuläre DNA). Bei konstanter Länge einer DNA-Sequenz steigt mit sinkender Konzentration die Wahrscheinlichkeit der intramolekularen Ligierung. Nach MANIATIS et al (1982) wird für die Insertgröße von ca. 20 kb dessen intramolekulare Konzentration der Enden j mit $1,3 \times 10^{12}$ Enden/ml angegeben, für die verklebten λ-Arme (ca.

30 kb) $6,6 \times 10^{11}$ Enden/ml. Die dafür angegebene λ -Konzentration beträgt 135 $\mu\text{g/ml}$. Daraus resultiert eine Insert-Konzentration von 43 $\mu\text{g/ml}$. Um das Verhältnis 30 kb : 20 kb zu berücksichtigen und zu verhindern, daß bei zu geringen Konzentrationen eine intramolekulare Ligierung stattfindet, wurden größere Konzentrationen im Verhältnis 3:2 benützt (Insert 100 $\mu\text{g/ml}$, λ -Arme 150 $\mu\text{g/ml}$). Daraus resultierte eine DNA-Gesamtkonzentration von 250 $\mu\text{g/ml}$ für den Ligaseansatz.

Vorherige Versuche hatten gezeigt, daß 1 μg Phagen-DNA für ca. 5×10^5 infektiöse Phagen ausreichend war. Vor der Ligierung wurde eine gemeinsame Ethanol-fällung der EMBL3A-Arme (1,5 μg) und des Inserts (1 μg) durchgeführt. Das vakuumgetrocknete DNA-Pellet wurde in 7,5 μl A.bdest aufgelöst, dann inkubiert (68°C, 10 min), um die cos-sites und die verklebten EcoRI-Schnittstellen zu lösen. Nach der Zugabe von 2 μl 5xLigasepuffer (Mat.2.7.) und 0,5 μl T4-DNA-Ligase (BOEHRINGER), wurde erneut inkubiert (12°C, über Nacht). Der Ligaseansatz wurde sofort für die in vitro-Verpackung benützt.

Die T4-DNA-Ligase wurde vor dem Versuch durch Verdau des EMBL3A-Wildtyps (z.B. mit EcoRI) und dessen anschließende Ligierung getestet. Durch anschließenden Verdau mit dem gleichen Restriktionsenzym (EcoRI) und dem Vergleich der Fragmentgrößen, wurde das Restriktionsenzym außerdem auf Exonuklease-Freiheit getestet.

Für die in vitro-Verpackung (HOHN+MURRAY 1977) des rekombinierten EMBL3A-Phagen wurde der GIGAPACK-Extrakt der Firma VECTOR CLONING SYSTEMS mit der Batch-Effizienz von $8,3 \times 10^8$ pfu/ μg wt- λ DNA benützt. Die Effizienz ist bei rekombinierten Phagen um den Faktor 10-100x geringer. Optimale Bedingungen für die Verpackung sind konkatemere DNA-Moleküle mit der Konzentration ≥ 250 $\mu\text{g/ml}$.

Der in vitro Packaging-Kit wurde bei -70°C gelagert und vor der Zugabe rasch aufgetaut. Zum Freeze/Thaw-Extrakt (Packaging Proteine) wurden 2 μl ligierte, rekombinierte Phagen-DNA (0,5 μg) pipettiert, dann 15 μl

des Sonic-Extraktes (Preheads). Der Ansatz wurde auf dem Vortex gemischt, dann inkubiert (22°C, 2 h). Danach erfolgte die Zugabe von 0,5 ml SM-Puffer (Mat.2.7.) und 20 µl Chloroform. Durch Zentrifugation wurde der Bakterienledebris entfernt (10000 rpm, 1 min, +4°C).

Für die Phagen-Titer-Bestimmung wurde als Wirtsbakterium VCS257, ein Subklon von DP50 supF (MANIATIS et al 1982) benützt, der im Gigapack-Kit enthalten war. Nach dem Ansatz einer frischen Übernachtskultur (30°C, 200 rpm) in 50 ml TBMM-Medium (Tab.Mat.2.7.), wurden die Bakterien pelletiert (2000 rpm, 10 min) und in 20 ml 10 mM MgSO₄ resuspendiert. Die optische Dichte OD der Bakterien wurde bei 600 nm bestimmt und auf OD=0,5 eingestellt ($1 \text{ OD}_{600} \approx 8 \times 10^8$ Zellen/ml, MANIATIS et al 1982).

Bei der Phagen-Titer-Bestimmung wurden für die Verdünnungen 5×10^5 Phagen/µg DNA ($\hat{=}$ 1 ml Phagenstock) angenommen. Daraus resultierten die Endverdünnungen von 10^{-3} , 10^{-4} und 10^{-5} des rekombinierten Phagen im SM-Puffer (Mat.2.7.). Als Kontrolle wurde wt-EMBL3A verwendet, bei dem ca. 10^9 Phagen/µg DNA erwartet wurden. Für die Bestimmung des Phagentiters wurden jeweils 200 µl der in 10 mM MgSO₄ resuspendierten VCS257 Bakterien zusammen mit 100 µl entsprechend verdünnten Phagen inkubiert (RT, 10 min). Nach der Zugabe von 3 ml Top-Agar (Tab.Mat.2.7.) (47°C), wurde der Ansatz sofort auf eine vorgewärmte, trockene TBM-Platte (Tab.Mat.2.7.) (85x15 mm) gegossen und nach Erstarren inkubiert (37°C, über Nacht). Die Platten wurden bei +4°C gelagert.

Nach Auszählen der Plaques wurde die Anzahl der Phagen/500 µl Verpackungsansatz bzw. Phagenstock berechnet. Die Ausbeute der infektiösen, rekombinierten EMBL3A ergab 2×10^6 Phagen/500 µl Ansatz bzw. /0,5 µg DNA Verpackungseffizienz. Damit war die Genbank ausreichend konzentriert, um direkt amplifiziert werden zu können (MANIATIS et al 1982).

Die Wahrscheinlichkeit P, daß jede DNA-Sequenz in der Genbank einmal

repräsentiert ist, läßt sich nach CLARKE+CARBON (1976) berechnen. Bei $P = 0,99$ und einer Insertgröße von 20 kb ist die notwendige Anzahl an Rekombinanten (N) ungefähr $6,9 \times 10^5$ (humane DNA, WINNACKER 1984). Durch die Anreicherung des Fragments bei der Erstellung der Genbank wurde jedoch N um ca. 10-30x erniedrigt. Für die Suche nach Klonen mit dem gesuchten Insert wurden 10 TBM-Platten (243 mm^2) mit je 5×10^4 Phagen und 2 ml VCS257 Bakterien $\text{OD}_{600}=0,5$ beschichtet (40 ml Top-Agar Tab.Mat.2.7.).

Nach Amplifikation der rekombinierten Bakteriophagen in VCS257, erfolgte das **Screening**, wobei die Klone identifiziert und isoliert wurden, die mit der pSVc-myc 1 Probe (Tab.4) hybridisierten. Dabei wurde die Methode der **Plaque-Hybridisierung nach BENTON+DAVIS** (1977) verwendet. Unverpackte Phagen-DNA, die in den einzelnen Plaques vorhanden sind, wurden an ein Nitrocellulose-Filter gebunden und hybridisiert.

Die inkubierten TBM-Platten wurden auf $+4^\circ\text{C}$ abgekühlt, sobald der Plaquesdurchmesser ca. 1,5 mm betrug. Für einen Plaquelift wurde ein Filter vorher markiert, dann auf dem Bakterienrasen ausgebreitet. Die Position der Markierung wurde auf den Boden der Platte, übereinstimmend zum Filter übertragen, um später die genaue Lokalisation eines Klons zu ermöglichen. Nach Inkubation ($+4^\circ\text{C}$, 20-60 min) wurde das Filter abgezogen.

Die DNA der einzelnen Plaques wurde denaturiert mit 0,1 N NaOH + 1,5 M NaCl (30 s), neutralisiert mit 0,2 M Tris-HCl pH 7,5 (30 s), anschließend mit 2xSSC (Mat.2.4.) gespült (30 s). Das Filter wurde gebacken und eingeschweißt. Bei der hoch-stringenten Hybridisierung (Tab.4) waren ca. 1×10^5 cpm/ml DNA-Probe ausreichend. Mit der Hybridisierungslösung konnten gleichzeitig mehrere Filter in einer Tüte hybridisiert werden.

Die Markierung auf dem Filter wurde durch Vorbelichtung auf den Film

übertragen. Die Expositionszeit für die Autoradiographie betrug 1-3 Tage. Danach wurde die Anzahl der positiven Klone/Platte und deren Lokalisation auf der Platte bestimmt. In diesem Fall wurden ca. 50 pSVc-myc 1 Klone/Platte gefunden (Tab.4, Abb.1).

Nach der Lokalisation eines Klon mit myc Sequenzen erfolgte das Picken dieses Plaques. Eine TBM-Platte (Tab.Mat.2.7.) wurde mit Bakterien in Top-Agar (Tab.Mat.2.7.) beschichtet. Mit einem sterilen Zahnstocher wurde zentral in den Plaque eingestochen, dann die Phagen in die 1. quadratische Markierung auf der kleinen Platte übertragen. Dieser Vorgang wurde mit frischen Zahnstochern wiederholt bis alle Quadrate mit Phagen dieses Plaques einmal infiziert waren. Nach Inkubation (37°C, über Nacht) erfolgte wieder eine Plaque-Hybridisierung nach BENTON+DAVIS (1977). Pro Platte (85x15 mm) wurde ein einzeln liegender, positiver Plaque 2-3x ausgestochen. Der Agarpfropfen wurde in 1 ml SM-Puffer (Mat.2.7.) gespült, und nach Zugabe von Chloroform, inkubiert (RT, 1-2 h). Der Phagenstock wurde bei +4°C gelagert.

Nach Bestimmung des Phagentiters wurde der Vorgang der Infektion von Bakterien mit gepickten Partikeln und anschließender Plaque-Hybridisierung der Klone, bis zur völligen Reinigung der einzelnen Klone durchgeführt (ca. 3x). Dazu wurden die Phagen mit der Impföse auf dem Bakterienrasen ausgestrichen (MANIATIS et al 1982, Abb.2). Pro Klon wurde dann erneut der Phagentiter bestimmt.

Ein gereinigter Klon enthielt einen Typ von Rekombinanten, von denen ein High-Titer-Phagenstock angelegt wurde. Von einer frischen Übernachtkultur wurden für jeden ausgestochenen Klon 100 µl VCS257 Bakterien verwendet. Nach der Inkubation (25°C, 10 min) erfolgte die Zugabe von 10 ml LB-Medium (Tab.Mat.2.7.) + 5 mM CaCl₂. Bei 38-39°C wurde bis zur Lyse der Bakterien geschüttelt. Der Bakteriendebris wurde abzentrifugiert (10000 rpm, 10 min). Pro Klon wurden 2-3x 0,9 ml des Überstands mit 1-2 Tropfen Chloroform in Glasröhrchen bei +4°C gelagert.



Abb.1: Plaquelift einer TBM-Platte (243 mm²) mit rekombinierten EMBL3A-Phagen, hybridisiert mit pSVc-myc 1 (Tab.4). EMBL3A-Phagen mit c-myc-EcoRI-Insert ergaben ein positives Hybridisierungssignal. Expositionszeit 1 Tag.

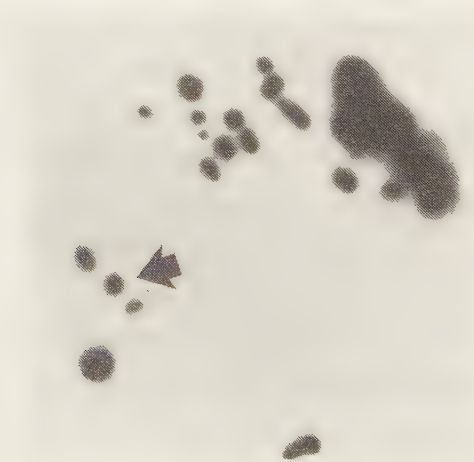


Abb.2: Plaquelift einer TBM-Platte (85x15 mm) mit gereinigten, rekombinierten EMBL3A-Phagen. Der isolierte, pSVc-myc 1 positive Einzel-Klon (Pfeil) enthielt nur einen Typ an Rekombinanten. Expositionszeit 1 Tag.

Danach erfolgte die Bestimmung des Phagentiters, wobei eine Ausbeute von 5×10^9 – 5×10^{10} pfu/ml erhalten wurde.

Für pSVc-myc 1 positive Klone (Tab.4) wurde die λ -Schnellpräparation (MANIATIS et al 1982) durchgeführt. 10 ml des Lysats aus einem High-Titer-Phagenstock wurden mit RNaseA (Mat.2.3.) und DNaseI (beide 1 μ g/ml) inkubiert (37°C, 30 min). Nach Zugabe von 10 ml 20 % PEG-6000 (ROTH) + 2 M NaCl in SM-Puffer wurde inkubiert (Eiswasser, 1 h). Die präzipitierten Phagen wurden abzentrifugiert (10000 rpm, 20 min, +4°C). Das Phagenpellet wurde in 0,5 ml SM-Puffer resuspendiert (Vortex). Der Debris wurde durch Zentrifugation (8000 rpm, 5 min, +4°C) entfernt. Der Überstand wurde mit 0,1 % SDS + 5 mM EDTA pH 8 inkubiert (68°C, 15 min). Die Extraktion der Proteine erfolgte mit 1x Phenol (Mat. 2.3.), 1x Phenol/Chloroform (1/1) und 1x Chloroform im Verhältnis 1:1, die Ethanolfällung mit 1 Vol Isopropanol. Nach dem Waschen, Zentrifugieren und Trocknen des Pellets wurde die DNA in 50 μ l TE pH 8 gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit der Tüpfelplatte, wobei eine Ausbeute zwischen 15–40 μ g DNA erhalten wurde. Die DNA konnte sofort mit einem Restriktionsenzym geschnitten werden, wobei gleichzeitig mit RNaseA (20 μ g/ml) inkubiert wurde.

2.8. Isolierung des 20 kb EcoRI-Fragments des rekombinierten EMBL3A-Phagen

Das klonierte, myc spezifische EcoRI-EcoRI DNA-Insert konnte nicht durch einen Verdau des rekombinierten EMBL3A-Phagen mit dem Restriktionsenzym EcoRI isoliert werden. Bei der Auftrennung der Fragmente in der Gelelektrophorese würden der 5' Arm (19,4 kb) und das DNA-Insert (ca. 20 kb) komigrieren. Die Subklonierung des Inserts in einen kleineren Vektor (Plasmid) wäre die ideale Lösung. Es zeigte sich jedoch, daß bei dem 20 kb E/E-Insert die Stabilität der Transformation zu gering war.

Als zweite Möglichkeit bot sich ein EMBL3A-spezifisches Restriktionsenzym, das den 5' Arm des EMBL3A in kleinere Fragmente

schnitt, nicht aber das DNA-Insert. Die rekombinierte Phagen-DNA verschiedener Klone wurde mit den Enzymen ApaI, StuI, NruI, BstEII und ClaI verdaut und die DNA mit der Probe pSVc-myc 1 (Tab.4) hybridisiert. Nur NruI schnitt nicht im Insert. Die NruI-Schnittstelle im 5' λ -Arm ist an der Basenposition 4590 (AMERSHAM).

Nach einem Doppelverdau mit NruI+EcoRI der DNA zweier verschiedener positiver Klone (aus Großpräparationen in LE392 Bakterien analog 2.7.), wurde nach der präparativen Methode das jeweilige Insert isoliert. Die so präparierten E/E-Klone wurden als Hybridisierungsproben (Tab.4, Klon 10 und 11) für die Restriktionsenzymanalyse verwendet.

2.9. Subklonierung des EcoRI-Fragments des Osteosarkoms TV389/1 in das pUC19-Plasmid

Für das Erstellen der Restriktionskarten der klonierten DNA-Inserts, wurden kleinere Stücke des großen E/E-Fragments subkloniert. Für die Subklonierung wurde das pUC19-Plasmid verwendet (VIEIRA+MESSING 1982, YANISCH-PERRON et al 1985, WINNACKER 1984). pUC19-Plasmide sind Insertionsvektoren, die einzige Polylinkersequenz befindet sich innerhalb des Selektionsmarkers lacZ.

Für die Subklonierung wurde das große EcoRI-Fragment mit dem Restriktionsenzym BamHI in kleinere Fragmente geschnitten. BamHI wurde gewählt, um zwei Parameter zu erfüllen. BamHI schneidet in den Polylinkern des Bakteriophagen EMBL3A und des pUC19-Plasmids, und das EcoRI-Fragment wurde in 5 kleinere mit einer Größe von 0,8-8,1 kb geteilt. Die BamHI-Fragmente waren in einem Größenbereich kleiner 10 kb, bei dem die Effizienz der Transformation nicht vermindert wurde (WINNACKER 1984).

Um eine hohe Ausbeute an rekombinierten Plasmiden zu erhalten, wurde bei der Ligierung darauf geachtet, daß das molare Verhältnis und die absoluten DNA-Konzentrationen von Vektor zu DNA-Insert intermolekulare Ligierung begünstigten (2.7., MANIATIS et al 1982, HOHN+COLLINS 1980).

Für die Rekombination wurde das im EMBL3A-Phagen integrierte 20 kb EcoRI-Fragment verwendet. Das Plasmid und der rekombinierte Phage aus der λ -Schnellpräparation wurden getrennt mit BamHI verdaut. Nach der Proteinextraktion (2.3.) und der gemeinsamen Ethanol-fällung, wurde das vakuumgetrocknete Pellet (pUC19 + EMBL3A-myc) für den 20 μ l-Ligaseansatz (2 μ g DNA, 2.7.) verwendet. Für die Transformation wurde der Ligaseansatz anschließend 1:10 mit TE verdünnt.

Bei der Transformation wird die nackte Plasmid-DNA von der Bakterienzelle aufgenommen (WINNACKER 1984). Dafür wurden kompetente JM83 Bakterien eingesetzt, deren Membran nach der Methode von COHEN et al (1972) mit CaCl_2 durchlässiger gemacht worden waren.

Für die Transformation wurden 10 μ l verdünnter Ligierungsansatz (100 ng) mit 40 μ l TE und 100 μ l kompetenten JM83 gemischt und zuerst 20 min in Eis inkubiert, dann 5 min bei 37°C. Nach Zugabe von 3 ml LB-Medium wurde geschüttelt (200 rpm, 30 min, 37°C), dann die Bakterien abzentrifugiert (3000 rpm, 10 min). Das Pellet wurde mit der Restflüssigkeit des Überstands resuspendiert. Um die ausreichende Dichte der Kolonien/Platte zu bestimmen, wurden je 10 μ l, 50 μ l und 100 μ l auf X-Gal/Amp-Platten (Tab.Mat.2.7.) ausgespatelt. Nach der übernacht-Inkubation erfolgte die Isolierung der positiven, weißen Subklone mit der Impföse. Diese Reinigungsschritte wurden 2-3x durchgeführt.

Aus einem isolierten Klon wurde die DNA mit der Plasmid-Schnellpräparation (HOLMES+QUINGLEY 1981, MANIATIS et al 1982) isoliert und analysiert. Pro Klon wurden 5 ml einer frischen Übernachtskultur (LB-Medium Tab.Mat.2.7. + 50 μ g/ml Ampicillin, 34°C) angesetzt. Danach folgte die Zentrifugation (3000 rpm, 10 min), das Pellet wurde in 0,7 ml Plasmid-Homogenisierungslösung (Mat.2.9.) resuspendiert. Nach Zugabe von 50 μ l Lysozym (10 mg/ml, SIGMA) wurden die Eppendorfgefäße für 30-40 s in kochendes Wasser gestellt. Nach 10 min in der Mikrozentrifuge wurden der Bakteriendebris mit sterilen Zahnstochern entfernt. Aus der DNA-

Lösung wurden die Proteine extrahiert (2.3.), nach der Ethanolfällung wurde das getrocknete Pellet in 50 µl TE gelöst. Die Ausbeute betrug ca. 1-6 µg DNA.

Pro Restriktionsenzymanalyse wurden 1-10 µl DNA-Lösung mit 1 U Enzym und 20 µg/ml RNaseA (Mat.2.3.) behandelt.

2.10. Großpräparation von Plasmiden

DNA-Inserts (Tab.4), die als Hybridisierungsproben verwendet wurden, wurden nach der Großpräparation des entsprechenden Vektors mit der präparativen Methode isoliert. Die Großpräparation von Plasmiden erfolgte nach der Methode von BIRNBOIM+DOLY (1979).

10 ml einer frischen Übernachtskultur des Wirtsbakteriums wurden für 1 l Hauptkultur verwendet. Nach Übernachts-Inkubation wurden die Bakterien abzentrifugiert (9000 rpm, 20 min, +4°C). Das gesamte Pellet wurde in 100 ml Birnboim-Lösung I + 2 mg/ml Lysozym bei +4°C gelöst und inkubiert (Eiswasser, 10 min). Die Bakterienzellen wurden in 200 ml frischer Birnboim-Lösung II vollständig lysiert. Nach Inkubation (0°C, 5 min) erfolgte die Zugabe von 150 ml der Birnboim-Lösung III und erneute Inkubation (0°C, 60 min). Nach Zentrifugation (28000 rpm, 30 min) wurden die Plasmide im Überstand mit 200 ml Ethanol gefällt. Die Plasmide wurden abzentrifugiert (9000 rpm, 20 min, +4°C), das Pellet in 10 ml

0,1 M Na-Acetat pH 5,2 aufgelöst und durch Zugabe von 20 ml Ethanol erneut gefällt. Nach der Zentrifugation wurde das abgetropfte Pellet in 2 ml TE gelöst. Nach der Zugabe von 100 µg/ml RNaseA (Mat.2.3.) (1-2 h), erfolgte die Inkubation mit 100 µg/ml Proteinase K (37°C, 1-2 h). Die Plasmid-DNA wurde isoliert analog 2.3.. Nach der Hydrolyse mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (s.Tab.4), wurde das Insert nach der präparativen Methode isoliert, gereinigt und für die Nick-Translation eingesetzt.

2.11. RNA Slot-Blot und Northern-Blot

Bei der **RNA-Präparation** wurde die RNase-Aktivität durch sterile Bedingungen und die Behandlung aller benützter Lösungen (außer Tris) mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat DEPC (SIGMA, Mat.2.11.) vermindert. Die Gesamt-RNA wurde aus Geweben mit einer modifizierten Guanidinium-Isothiocyant/Cäsiumchlorid-Methode isoliert (CHIRGWIN et al 1979).

Das Gewebe wurde analog der DNA-Präparation im BRAUN Mikro-Dismembrator zerkleinert, nur wurden vorher 0,5 ml Lysispuffer (Mat.2.11.) zum flüssigen Stickstoff dazugegeben. Das Pulver wurde mit weiteren 2,5 ml Lysispuffer verrührt und vollständig gelöst (Vortex, RT). Die DNA wurde solange durch Ultraschall gebrochen, bis die Lösung nicht mehr fädig war (ca. 15 s, +4°C). Nach der Zentrifugation (6000 rpm, 10 min, 15°C) wurde der Überstand vorsichtig auf 2 ml Cäsiumchlorid-Lösung (Mat.2.11.) in einem SW50.1-Röhrchen (BECKMAN) geschichtet. Im Ausschwingrotor wurde über Nacht zentrifugiert (40000 rpm, 20°C). Der Überstand wurde abgesaugt, der Rest abgekippt, das RNA-Pellet 1x mit DEPC-A.bidest (Mat.2.11.) gewaschen und in 2x150 µl DEPC-A.bidest aufgelöst. Die RNA-Konzentration wurde mit der Tüpfelplatte (ribosomale RNA als Standard) bestimmt und die RNA mit 2,5 Vol Ethanol gefällt. Diese Mischung wurde bei -70°C gelagert.

Für Slot-Blot und Northern-Blot wurden die entsprechende RNA-Menge aus dem Alkohol entnommen.

Beim **RNA Slot-Blot** wurden verschiedene Gesamt-RNA Proben auf eine Biotodyne A Nylon-Membran (PALL) aufgebracht, pro Slot 5-15 µg RNA. Das entsprechende RNA-Ethanol-Volumen wurde entnommen und nach der Zentrifugation mit 70 % Ethanol gewaschen. Das getrocknete RNA-Pellet wurde in 20 µl DEPC-A.bidest resuspendiert, die Konzentration auf der Tüpfelplatte überprüft (1 µl). Vor dem Auftragen auf die Biotodyne-Membran wurde die RNA denaturiert durch Zugabe von 6xSSC + 7,4 % Formaldehyd (37 %) und Inkubation (60°C, 15 min). Mit Hilfe der Slot-Blot-Apparatur

(Minifold II, SCHLEICHER+SCHUELL) wurden die Proben auf die vorbehandelte Membran (DEPC-Abidest, 20xSSC äquibriilliert) durch Vakuum übertragen.

Die Membran wurde gebacken (80°C, 1 h) und in eine Hybridisierungs-Hülle eingeschweißt. Sie wurde vor der Hybridisierung oder nach der Dehybridisierung im trockenen Zustand gelagert. Nach einer Hybridisierung wurde die gewaschene Membran feucht in eine Folie eingeschweißt und exponiert, um ein irreversibles Binden der DNA-Probe zu verhindern.

Für die Bestimmung der Expressionshöhe wurden Slot-Blots (Gesamt-RNA) mit der Probe pSVc-myc 1 hybridisiert (Tab.4). Für die Normierung der aufgetragenen RNA-Menge wurden dieselben Slots mit der Actin Probe (p λ Hac-69A, Tab.4) hybridisiert. Der Schwärzungsgrad der einzelnen Slots (Expositionszeit 20 h), wurde mit dem Densitometer (LKB) gemessen. Der Wert für die myc-Hybridisierung wurde mit dem Actinwert verrechnet.

Mit Hilfe der Northern-Blot-Methode (McMASTER+CARMICHAEL 1977) wurde die Gesamt-RNA in der horizontalen Gelelektrophorese aufgetrennt. Der Agarosegehalt des Gels richtete sich nach der zu erwartenden mRNA-Länge (1,0-1,4 % MANIATIS et al 1982). Während der Elektrophorese (Minigel, 70 V, ca. 4 h) wurde der Laufpuffer (0,01 M Na-Phosphat pH 7,0) mit der Pumpe umgewälzt, um pH-Gradienten zu vermeiden. Die RNA wurde vor dem Auftragen auf das Gel mit Glyoxal (MERK) und Dimethylsulfoxid DMSO denaturiert. Das RNA-Pellet (3-20 μ g) wurde wie bei der RNA Slot-Blot-Methode gewonnen. Nach dem Trocknen wurden 16 μ l Glyoxilierungsmix (Mat.2.11.) dazugegeben, das Pellet aufgelöst und inkubiert (50°C, 1 h). Nach Abkühlung auf RT wurden 4 μ l Ladepuffer BPB III (Mat.2.11.) hinzugefügt. Als Längenstandard wurde λ -DNA (LS II; McMASTER+CARMICHAEL 1977, CARMICHAEL+McMASTER 1980; + 32 -P markiertem LS II) verwendet, der vor dem Auftragen ebenfalls glyoxiliert worden

war. Die RNA wurde nach der Auftrennung im Gel sofort auf eine vorbehandelte Biodyne-Membran mit Hilfe der Northern-Blot-Methode übertragen. Der Aufbau für den RNA-Transfer auf die Membran, stimmte mit dem des Southern-Blots überein (2.4.).

Nach der Hybridisierung (Tab.3) und der Autoradiographie, erfolgte die Bestimmung der Fragmentgrößen der mRNA analog der der DNA (2.5., MANIATIS et al 1982).

3. und 4. Ergebnisse

3. Veränderung des c-myc Protooncogens in murinen Osteosarkomen

3.1. Untersuchung muriner Osteosarkome auf veränderte Oncogene

In Osteosarkomen werden häufig die Oncogene c-sis, c-mos und c-myc exprimiert (EVA et al 1982, GRAVES et al 1984, SCHWAB et al 1985, SCHÖN et al 1986, YOKOTA et al 1986). Die Expression des betroffenen Oncogens wird dabei häufig durch eine Genstrukturänderung verursacht (Duesberg 1987). Deshalb wurden die Transplantatlinien, die Primärtransplantate und die Zelllinien von murinen Osteosarkomen (Tab.1) auf eine Strukturänderung der Oncogene c-sis, c-mos und c-myc untersucht.

Für die Oncogene c-sis und c-mos wurden in keinem der untersuchten Tumoren eine Veränderungen gefunden (Tab.5 Zelllinien, Abb.6II, 7II, 10BIII Primärtransplantate, Abb.4II, 8II, 10AIII Transplantatlinie TV).

In 3 der 26 murinen Osteosarkome, in den Primärtransplantaten OTS35/1, OTS95/1 und in der Linie TV, wurde eine Strukturänderung des c-myc Protooncogens nachgewiesen (Tab.6, Abb.3, 5, 6, 7). Das c-myc Gen war in allen drei Tumoren amplifiziert. Der Tumor der Transplantatlinie TV und das Primärtransplantat OTS35/1 zeigten zusätzlich ein Rearrangement des Gens, das deshalb als rc-myc Gen bezeichnet wird.

Die Osteosarkomzelllinie OS2 und die entsprechende Keimbahn-DNA der C3Hx101/F₁-Maus zeigte eine veränderte EcoRI-Schnittstelle im c-myc Gen (Tab.6, 25 kb statt 20 kb).

3.2. Veränderung des c-myc Oncogens in murinen Osteosarkomen

3.2.1. Das rearrangierte und amplifizierte c-myc Gen im Osteosarkom der Transplantatlinie TV

Die Amplifikation und das Rearrangement des c-myc Gens im Osteosarkom der Transplantatlinie TV wurde nun genau untersucht, da eine

I. v-mos (p-src)

Tumor	BamHI	EcoRV
OS5	23	21
OS2		

II. v-sis (pC60)

Tumor	BamHI	SacI
OS5	7,2 + 5,4 + 1,5	11,8 + 6,0 + 4,2
OS23		
Os2		

Tab.5: Restriktionsenzymanalysen der Oncogene c-mos und c-sis in den Osteosarkom-Zelllinien OS2 (C3Hx101/F₁), OS5 und OS23 (NMRI). Fragmente (kb), nach Verdau der hochmolekularen DNA mit den Restriktionsenzymen BamHI, SacI und EcoRV. Nach der Auftrennung der Fragmente in der Elektrophorese, wurde das NC-Filter mit den viralen Oncogen-Proben v-mos (p-src) und v-sis (pC60) hybridisiert.

	BamHI	EcoRI	SacI
NMRI	5,6	20	13,3 1,4
C3Hx101/F ₁	"	25 ★	"

I.

OS2	n	★	n
OS5	n	n	n
OS23	n	-	n

II.

TV	A/R	A	A/R
TVC	-	n	-
TVK	-	n	-
T-FBJ	-	n	-
DOS	-	n	-

Tab.6: Restriktionsenzymanalyse des c-myc Oncogens in den Zelllinien und den Transplantatlinien muriner Osteosarkome.

Die DNA I. der Zelllinien OS2, OS5 und OS23 (Stamm s.Tab.5), und II. der Transplantatlinien TV, TVC, TVK, T-FBJ und DOS (Stamm s.Tab.1) wurden mit den Enzymen BamHI, EcoRI und SacI geschnitten. Nach der Gelelektrophorese der Fragmente (kb), wurde das Filter mit der Probe pSVc-myc 1 hybridisiert.

n Fragment entspricht Kontroll-DNA, A Fragment entsprach Kontrolle und war amplifiziert, R Fragment war rearrangiert, ★ Fragment von 25 kb, statt 20 kb. - nicht getestet.

erhöhte Transkription des Gens im Tumor nachgewiesen worden war (SCHÖN et al 1986).

Da das Osteosarkom TV als Transplantatlinie gehalten wurde, wurde überprüft, ob die Amplifikation und das Rearrangement des c-myc Gens in verschiedenen Tumorgenerationen und Tumorenindividuen (2.1.) nachzuweisen sind und welche Variationen eintreten.

Abb.3 und 4 zeigen, das in allen untersuchten Tumoren der Linie TV das c-myc Gen amplifiziert ist. Das Restriktionsenzymmuster änderte sich nicht im Untersuchungszeitraum von 1974 bis 1985 (Abb.3, Induktion 1973).

Alle (rearrangierten) myc Gene lagen im Tumor auf normalen EcoRI/EcoRI-Fragmenten (ca. 20 kb). Das Enzym EcoRI schneidet außerhalb des normalen c-myc Gens (s.Abb.18). Die Proben pSVc-myc 1 und S421/1 (Tab.4), die zusammen - außer dem 1. Intron - das gesamte normale c-myc Protooncogen überdecken, hybridisierten in den Tumoren ausschließlich mit dem 20 kb E/E-Fragment, das sich nicht von der Keimbahn-DNA unterschied, jedoch stark amplifiziert war (Abb.3A, 4I,III). Zusätzliche pSVc-myc 1-positive Banden traten bei einzelnen Osteosarkomen auf, waren jedoch schwach, meist nicht diskret (z.B. TV209 EcoRI) .

Ein Vergleich der Autoradiographie mit dem entsprechenden Gel zeigte, daß die NMRI Kontroll-DNA in ausreichender Menge aufgetragen worden war und damit in den TV-DNAs tatsächlich mehr Kopien des c-myc Gens als normal vorlagen (Abb.3BII).

Abb.3: Restriktionsenzymanalyse des c-myc Oncogens verschiedener Tumorgenerationen der Transplantatlinie TV von 1974 bis 1985.

Die DNA von 6 Tumorgenerationen und der Kontrolle, wurde mit den Enzymen A. EcoRI (Spur 1-7) und B.I. BglI (1-7) und SacI (8-10) geschnitten, B.II. gel-elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Nach der Hybridisierung des Filters mit pSVc-myc 1, erfolgte die Exposition: (A.) 4 h und (B.I.) 20 h.

(1)+(8) NMRI Leber, (2)+(9) TV318 (1982), (3)+(10) TV385 (1985), (4) TV144 (1976), (5) TV 159 (1976), (6) TV40 (1974), (7) TV209 (1978). Längenstandard LSII (kb).

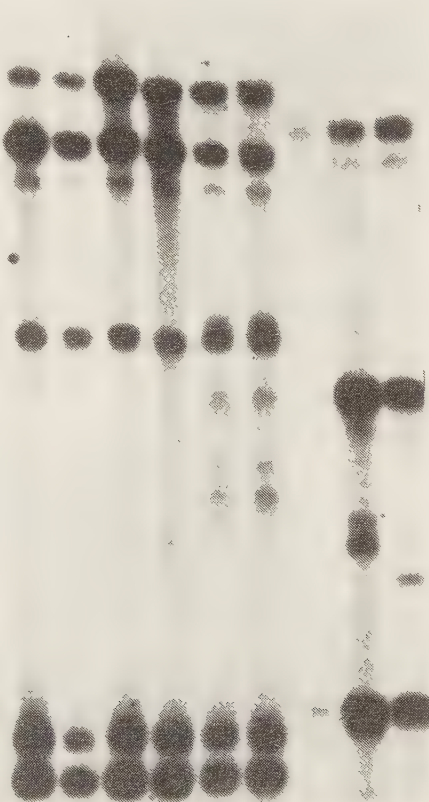
A

1 2 3 4 5 6 7

(kb)

**B.I**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

**B.II**

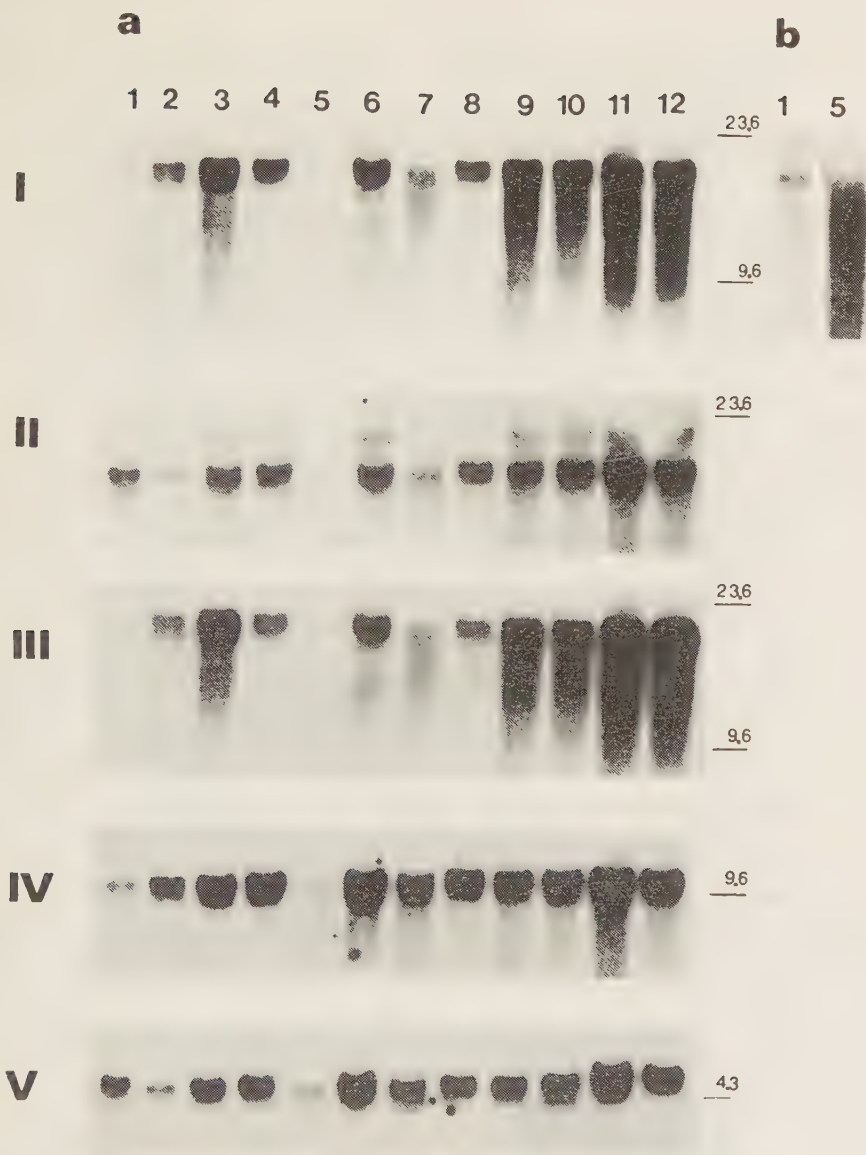
1 2 3 4 5 6 7



Mit Enzymen, die innerhalb des c-myc Gens schneiden (s.Abb.12), konnte ein Rearrangement bei allen Tumoren der Linie TV gezeigt werden, das sich im wesentlichen während des Untersuchungszeitraums nicht änderte (Abb.3BI). Veränderte Restriktionsenzymschnittstellen in der hochmolekularen Tumor-DNA wurden mit den Enzymen SacI und BglI gezeigt. Die Restriktionsenzyme SacI und BglI, führten außer zu den normalen Fragmenten der Keimbahn-DNA (BglI 18,1 kb, 4,6 kb, 1,2 kb; SacI 13,3 kb, 1,4 kb), zu zusätzlichen, rearrangierten Fragmenten (BglI 10,5 kb, 9,3 kb, 1,4 kb; SacI 10,9 kb, 3,8 kb) mit der Probe pSVc-myc 1. Bei den Enzymen SacI und BglI war im Tumor der Linie TV immer eine Amplifikation der normalen und der rearrangierten Banden zu beobachten. Bei der Linie TV zeigten auch die Tumoren, die mit unterschiedlichen Methoden im Tier erzeugt wurden, keine Änderung im Rearrangement des c-myc Gens. Ebenso blieb die Amplifikation der normalen und der rearrangierten enzymspezifischen Fragmente erhalten.

Abb.4 zeigt den Individuen-spezifischen Tumor TV386/1 (1985), sowie 2 Tumoren des TV389. Tumoren des TV389 resultierten aus Injektionen von Zellen des TV386 (jeweils 3×10^6 Zellen der 5. Passage intramuskulär in 3 NMRI-Mäuse). Die DNA des Tumors TV389/1Z stammte aus der Zellkultur von TV389/1 (13. Passage). Die 2 Individuen-spezifischen Tumoren des TV390 stellten die Transplantate eines Osteosarkoms des TV389 dar. TV388 mit 5 Individuen stammte aus der Transplantation des Tumors TV259 (1980, eingefroren in DMSO). Die DNA des Tumors TV389/1Z aus der Zellkultur war degradiert, doch erschienen nach längerer Expositionszeit ebenfalls nur die beschriebenen Banden (Abb.4Ib, 20 h).

Abb.4: Restriktionsenzymanalysen einzelner Individuen der Tumorgenerationen TV386, TV389, TV390 und TV388. Die DNA der Tumoren und der Kontrolle NMRI, wurde mit dem Enzym EcoRI geschnitten, aufgetrennt und geblottet. I. Nach der Hybridisierung mit der Probe pSVc-myc 1, erfolgte die Exposition: 2 h (a) und 20 h (b). II. Nach der Hybridisierung mit der mos-spezifischen Probe (p-src), wurde 100 h exponiert. Die Fragmente von 20 kb stellen die nicht völlig



dehybridisierte pSVc-myc 1-positive Bande von I. dar. III. Die Hybridisierung mit S421/1 wurde 12 Tage exponiert. IV. Die Hybridisierung mit der Mlv1-1 Probe (pTS25E/P) wurde 3 Tage exponiert; V. die mit der Mlv1-2 Probe (pTS10) 7 Tage.

(1) NMRI Leber, (2) TV 386/1, (3) TV389/1, (4) TV389/2, (5) TV389/1Z, (6) TV390/1, (7) TV390/2, (8)-(12) TV388/1 bis TV388/5. Längenstandard LSII (kb).

3.2.2. Das c-myc Oncogen in Primärtransplantaten OTS von strahleninduzierten Osteosarkomen der NMRI-Maus

Um einen Alterungseffekt für die Ursache des veränderten c-myc Oncogens in den Tumoren der Linie TV (NMRI) auszuschließen, wurden insgesamt 18 Osteosarkome einmal transplantiert und diese Primärtransplantate OTS der NMRI Maus (Tab.1C) untersucht. In den Primärtransplantaten OTS35/1 und OTS95/1 wurde ein amplifiziertes c-myc Oncogen nachgewiesen, das im OTS35/1 zusätzlich rearrangiert war (Abb.5I, 6I, 7I).

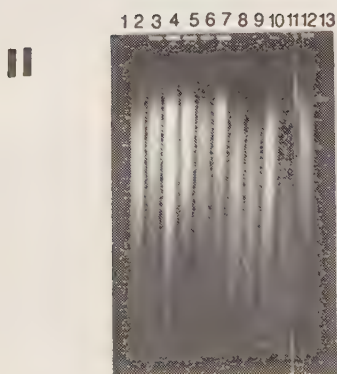
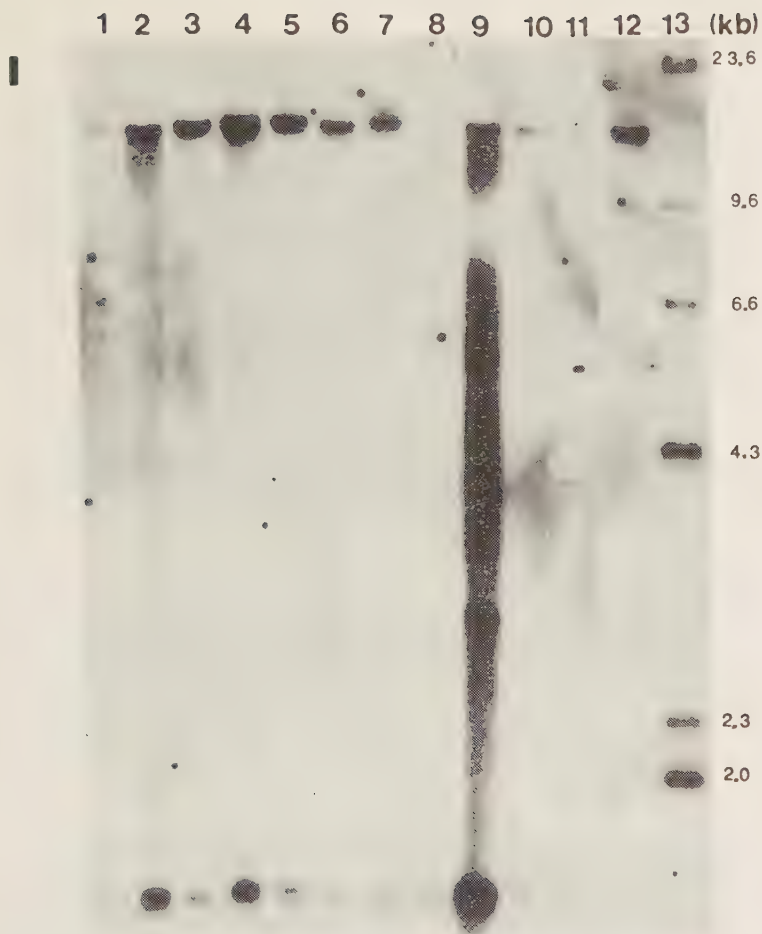
Der Tumor OTS35/1 zeigte im SacI-Verdau mit der Probe pSVc-myc 1 (Tab.4), außer dem normalen Fragment von 13,3 kb, ein amplifiziertes, normales von 1,4 kb und eine schwache, zusätzliche Bande von 3,0 kb (Abb.5I,II). Im EcoRI-Verdau war mit der Probe S421/1, wie beim Tumor TV, nur das normale 20 kb Fragment amplifiziert (Abb.7I,II). Die DNA-Präparation vom OTS35/1 war degradiert. Nach längerer Expositionszeit von 5 Tagen, war jedoch ausschließlich das Fragment von 20 kb sichtbar (Abb.7Ia).

Das Primärtransplantat OTS95/1 zeigte mit der Probe pSVc-myc 1 im EcoRI-Verdau ebenfalls wie OTS35/1 und der Tumor TV nur die normale, amplifizierte Bande von 20 kb (Abb.7I,II). In der Restriktionsenzymanalyse mit BglI, wies OTS95/1 ein amplifiziertes, aber nicht rearrangiertes 18,1 kb Fragment mit der Probe S421/1 auf.

Abb.5: Restriktionsenzymanalyse des c-myc Oncogens in Primärtransplantaten OTS aus strahleninduzierten Osteosarkomen der NMRI Maus.

Nach dem SacI-Verdau der DNA, wurden die Fragmente in der Gelelektrophorese aufgetrennt (II.). Das geblottete Filter wurde mit der Probe pSVc-myc 1 hybridisiert (I.). Expositionszeit 100 h.

(1) OTS7, (2) OTS9, (3) OTS11, (4) OTS12 Tumorgewebe, (5) Muskelgewebe aus Individuum mit Tumor OTS12, (6) OTS19 Tumorgewebe, (7) Muskelgewebe aus Individuum mit Tumor OTS19, (8) OTS27, (9) OTS35/1. (10) OTS36, (11) OTS37, (12) NMRI Leber, (13) Längenstandard LSII (kb).



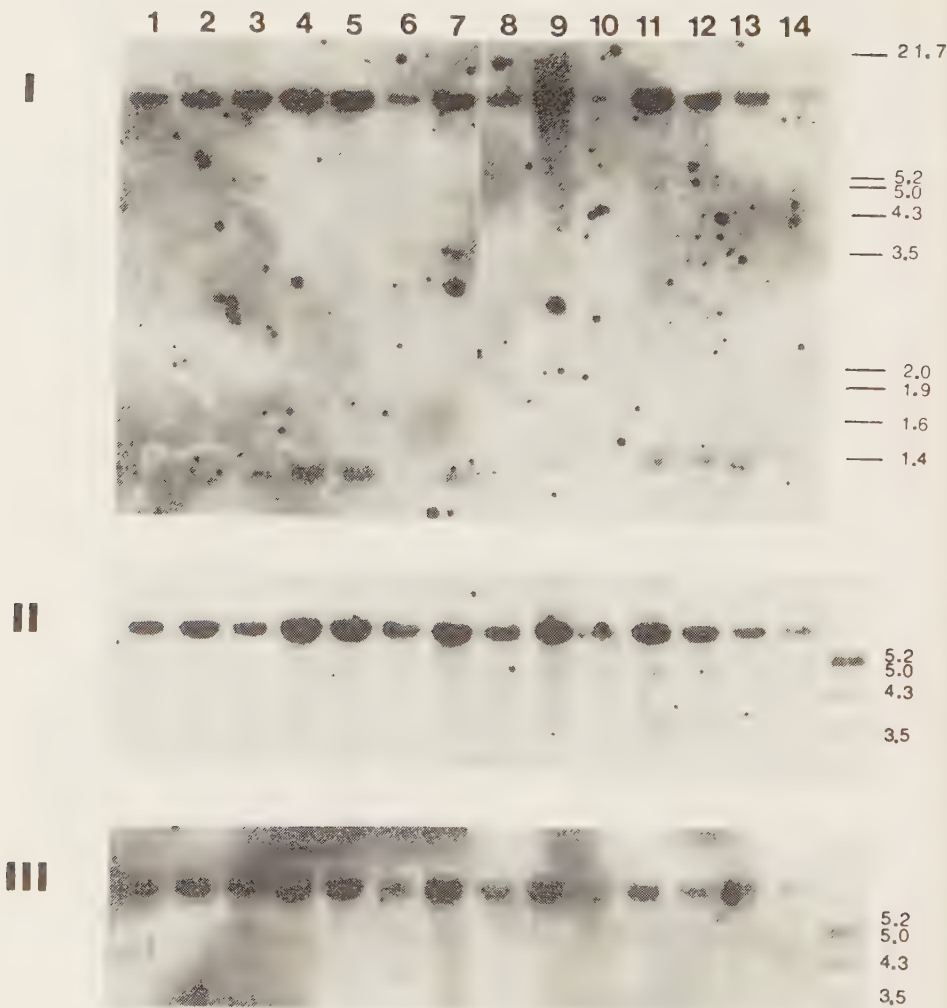


Abb.6: Restriktionsenzymanalysen der Primärtransplantate OTS aus strahleninduzierten Osteosarkomen der NMRI Maus.

Die DNA der 13 Primärtransplantate OTS aus 7 murinen Osteosarkomen wurde nach SacI-Verdau, elektrophoretischer Auftrennung und Blotting, hybridisiert I. mit pSVc-myc 1. Expositionszeit 6 Tage. II. Nach der Hybridisierung mit der v-mos Probe (p-src), wurde die Autoradiographie 7 Tage exponiert. III. Die Hybridisierung mit der Mlvi-1 Probe (pTS26P/P) wurde 21 Tage exponiert.

(1)-(2) OTS128/1-2, (3)-(6) OTS126/1-4, (7) OTS121/1, (8)-(9) OTS112/1-2, (10) OTS107/1, (11) OTS101/1, (12)-(13) OTS98/1-2, (14) NMRI Leber. Längenstandard LSIII (kb).

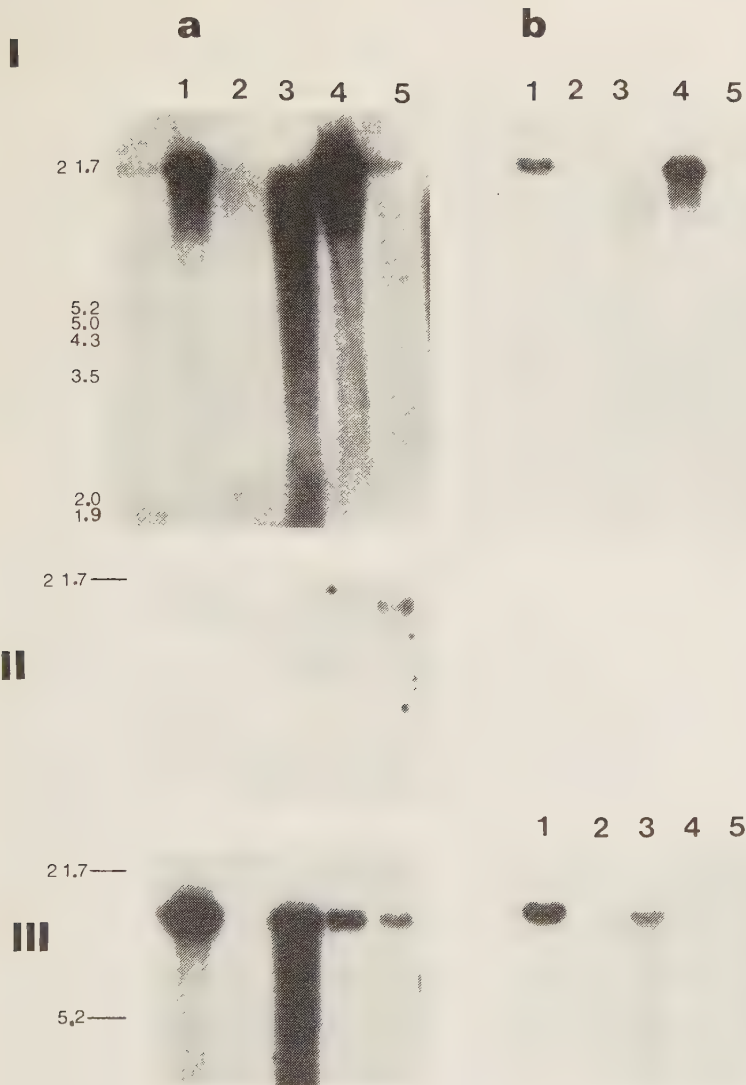


Abb.7: Restriktionsenzymanalysen der Primärtransplantate OTS und des Transplantattumors TV aus Osteosarkomen der NMRI Maus.

Die DNA der 3 Primärtransplantate OTS und die des Tumors TV389/1 wurde mit EcoRI verdaut (DNA von OTS35/1 und OTS50/1 degradiert). Nach Auftrennung der Fragmente und Blotten wurde I. hybridisiert mit der Probe (S421/1) und 5 Tage (a) und 1 Tag (b) exponiert. II. Die Hybridisierung mit der v-mos Probe (p-src) wurde 7 Tage exponiert. III. Die Hybridisierung mit der Mlvi-1 Probe (pTS26P/P) wurde 4 Tage (a) und 1 Tag (b) exponiert.

(1) OTS95/1, (2) OTS50/1, (3) OTS35/1, (4) TV389/1, (5) NMRI Gehirn. Längenstandard LSHI (kb).

3.2.3. Amplifikationsgrad des c-myc Oncogens in murinen Osteosarkomen der NMRI-Maus

SCHWAB et al (1985) zeigten in Zelllinien eines murinen Osteosarkoms eine 15 bis 30-fache Amplifikation des c-myc Oncogens. Bei den drei Osteosarkomen der NMRI Maus, die ein amplifiziertes c-myc Oncogen aufwiesen, wurde deshalb der Amplifikationsgrad des Gens bzw. der der enzyspezifischen Fragmente bestimmt (s.2.5.). Diese Bestimmung war keine absolute Messung der vervielfältigten Genkopien und gibt nicht die genaue Anzahl der c-myc Gene im Genom des einzelnen Tumors an.

In der Transplantatlinie TV variierte der Amplifikationsgrad myc-spezifischer Fragmente, sowohl in Tumoren aus verschiedenen Generationen, als auch in Tumoren aus einzelnen Individuen einer Generation (Tab.7, Abb.3, 4I,III, 8I,IV,V). Innerhalb eines Tumors zeigten Fragmente eines Enzymverdaus ebenfalls einen unterschiedlichen Amplifikationsgrad (Tab.8, Abb.3BI, 8I).

Für das EcoRI-Fragment von 20 kb wurde der Amplifikationsgrad bestimmt. Tab.7 zeigt, daß der Amplifikationsgrad des EcoRI-Fragments, auf dem alle c-myc homologen Sequenzen lokalisiert sind, zwischen den Individuen einer Generation variierte. Die c-myc homologen Sequenzen in den Tumoren der Linie TV lagen stark amplifiziert vor (mindestens 30-fach).

Für die Tumoren TV144 und TV385 wurden die Amplifikationsgrade der normalen und der rearrangierten Fragmente in einer Verdünnungsreihe des SacI-Verdaus bestimmt (Abb.8I,IV,V). Tab.8I-III zeigt den Amplifikationsgrad der SacI-Fragmente in den beiden TV-Tumoren mit den drei myc spezifischen Proben S421/1, pSVc-myc 1 und U167/11.

In den beiden Primärtransplantaten OTS35/1 und OTS95/1 war das c-myc Oncogen, wie im Tumor TV, stark amplifiziert (Abb.5I,II, 7I,II). Für den SacI-Verdau des rearrangierten OTS35/1 war für das normale Fragment von 13,3 kb keine Amplifikation feststellbar (Abb.5I).

Transplantat-Tumoren TV

	386/1	389/1	/2	390/1	/2	388/1	/2	/3	/4	/5
EcoRI										
20 (kb)	40	40	30	30	30	40	40	40	40	40

Tab.7: Amplifikationsgrad des c-myc Oncogens in Tumoren der Transplantatlinie TV.

Für den Amplifikationsgrad der EcoRI-Fragmente der Tumorindividuen aus 4 Generationen wurde nach der Hybridisierung mit pSVc-myc 1, die Autoradiographien von 2 h und 20 h verwendet (Abb.4Ia,b). Als DNA-Mengenkontrolle diente die Hybridisierung mit der mos Probe (p-src, Abb.4II). Für die degradierte DNA des TV389/1Z wurde kein Amplifikationsgrad bestimmt.

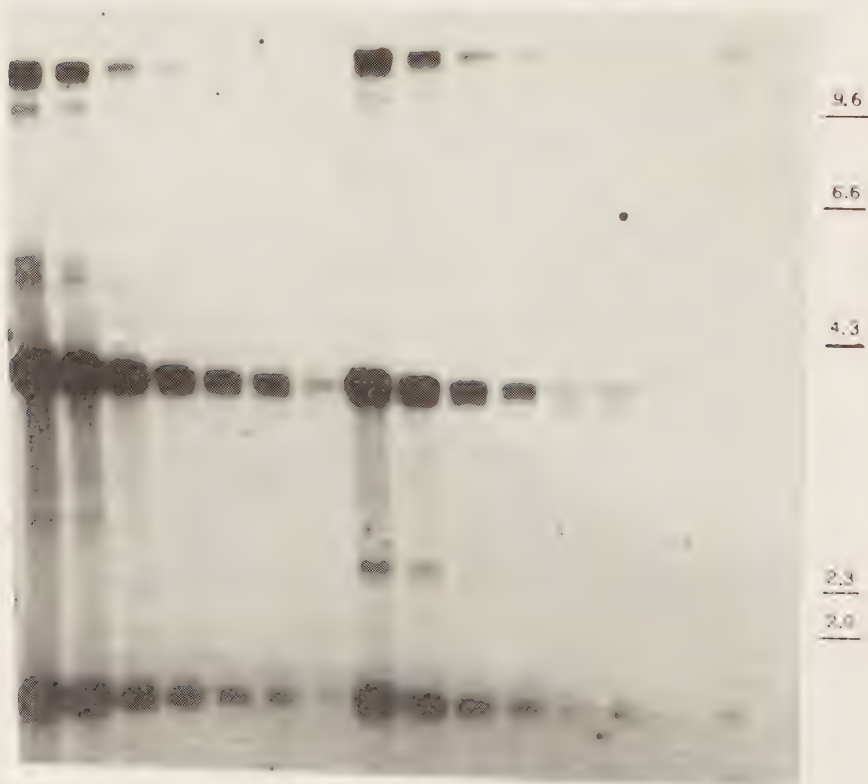
	TV144	TV385
I. S421/1		
n: 2,3	200	50
II. pSVc-myc 1		
n: 13,3	10	10
1,4	100	50
r: 11,0	4	2
4,1	200	100
III. U157/11		
n: 13,3	10	10
r: 4,1	200	50
IV. pTS25E/P		
n: 6,9	20	20

Tab.8: Amplifikationsgrad der 3 Exons des myc Oncogens und des Mlvi-1 Locus in den Tumoren TV144 und TV385.

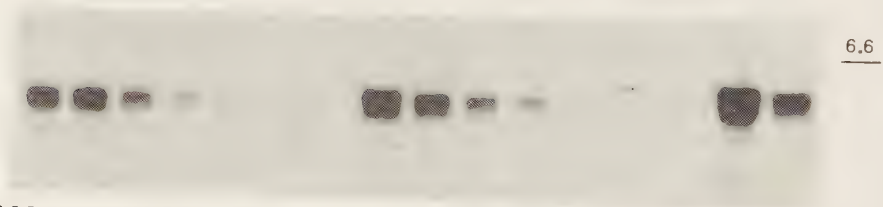
Die Verdünnungsreihen der DNAs wurden mit den Proben I.-IV. hybridisiert (SacI, Abb.8). Als DNA-Mengenkontrolle wurde die Hybridisierung mit der mos Probe verwendet (p-src, Abb.8II). Der Amplifikationsgrad wurde nach 2.5. bestimmt. I. Probe für 1. Exon des c-myc Gens S421/1 (Abb.8IV). II. Probe für 2. und 3. Exon des c-myc Gens pSVc-myc 1 (Abb.8I). III. Probe für 3. Exon U157/11 (Abb.8V). IV. Probe für Mlvi-1 pTS25E/P (Abb.8III). n normale Fragmente, r rearrangierte Fragmente.

I

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



II



III



IV

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



V

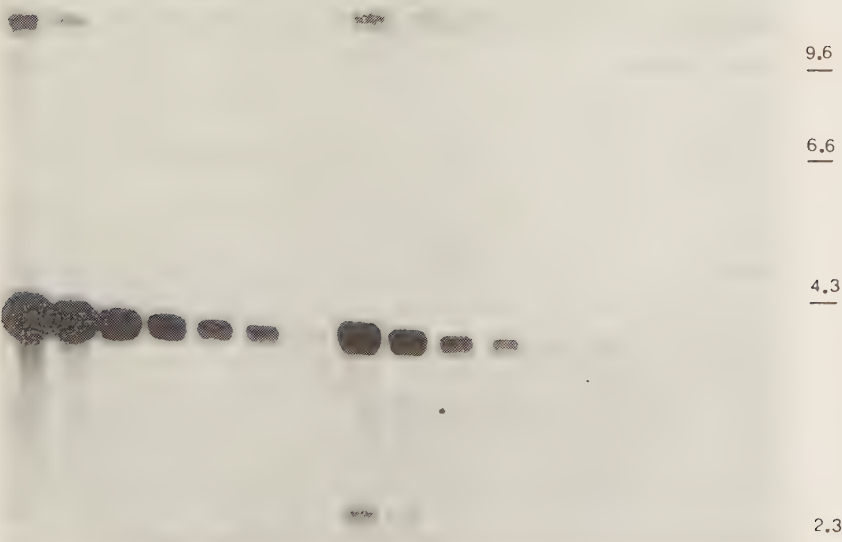


Abb.8: Verdünnungsreihe der DNA der Tumoren TV144 und TV385 zur Bestimmung des Amplifikationsgrads des myc Gens und des Mlvi-1 Locus. Die DNA der beiden Tumoren und der NMRI Kontrollmaus wurde mit *Sac*I verdaut und in einer Verdünnungsreihe aufgetragen. Nach Gelelektrophorese und Blotten, wurde das Filter hybridisiert. I. Probe pSVc-myc 1. Expositionszeit 20 h. II. v-mos Probe (p-src), Expositionszeit 11 Tage. III. Mlvi-1 Probe (pTS25EP), Expositionszeit 5 Tage. IV. Probe S421/1, Expositionszeit 20 Tage. V. Probe U157/11, Expositionszeit 3 Tage.

(1)-(7) TV144, (8)-(14) TV385, (15)-(16) NMRI Gehirn.
 (1)+(8)+(15) 10 µg, (2)+(9)+(16) 5 µg, (3)+(10) 2 µg, (4)+(11) 1 µg,
 (5)+(12) 0,5 µg, (6)+(13) 0,4 µg, (7)+(14) 0,1 µg DNA/Tasche.
 Längenstandard LSH (kb).

3.2.4. Tumorgenese und Vergleich mit der Balb/c-Maus

In drei der 22 Osteosarkome der NMRI-Maus (Tab.1) wurde ein amplifiziertes c-myc Oncogen festgestellt (13%), das in zwei Tumoren zusätzlich rearrangiert war. Insgesamt waren 26 Osteosarkome untersucht worden.

Bei Balb/c-Mäusen wurden bei analogen Studien in 7 von 28 Osteosarkomen (25%) ein amplifizierter c-myc Locus gefunden, wobei in einem Tumor ebenfalls ein Rearrangement festgestellt worden waren (STRAUSS, persönl. Mit.). Die 28 Osteosarkome der Balb/c Maus waren alle Primärtransplantate und außer einem spontanen (OTS79), mit Thorium ^{227}Th induziert worden.

Insgesamt waren damit in 10 von 54 murinen Osteosarkomen ein amplifiziertes, teilweise rearrangiertes c-myc Oncogen gefunden worden.

Bei den Untersuchungen der Osteosarkome waren zum Teil Primärtransplantate benützt worden. Der Zeitpunkt, bei dem das ungefähr 1 cm³ große Primärtransplantat aus dem Tier entnommen wurde, wies einen Medianwert von $\bar{x}=48$ Tagen auf (n=14, 1. Quartil: 34 Tage; 3. Quartil: 67 Tage). Das Primärtransplantat OTS95/1 mit amplifiziertem c-myc Gen, wurde nach 47 Tagen entnommen, OTS35/1 nach 54 Tagen. Beide Tumoren unterschieden sich damit in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit nicht von den Primärtransplantaten, die ein normales c-myc Gen aufwiesen.

Die Tumoren der Transplantat-Linie TV hatten nach ca. 3 Wochen die Größe von 1 cm³ erreicht.

Nur einer der zwei NMRI Primärtumoren, deren Primärtransplantate eine Veränderung des c-myc Protooncogens aufwiesen, metastasierte. Der Primärtumor des OTS35/1 führte zu Wucherungen in der Milz, der des OTS95/1 metastasierte nicht.

Die Veränderung des c-myc Gens führte nicht immer zu einer 100 % Transplantationsrate. Der Primärtumor der Transplantate OTS35/1 und

OTS95/1 war jeweils nur in 1 von 5 NMRI Tieren angewachsen.

Die Tumorstücke der Transplantatlinie TV führten bei jeder Passage, in der nächsten Generation in allen 5 eingesetzten Tieren zum Tumor. Sämtliche Zellinjektionen und die Transplantationen eines eingefrorenen Tumors, führten in allen betroffenen Tieren zum Osteosarkom (TV389 und TV388, s.3.2.1.).

3.3. Bereich der Amplifikation im Genom der murinen Osteosarkome der NMRI-Maus

ROBERTS et al (1983), KINZLER et al (1986) und VIJVER et al (1987) zeigten, daß die Amplifikation von Segmenten einen großen DNA-Bereich umfaßt. Bei der Maus (*Mus musculus*) ist der Genort für das Protooncogen c-myc auf dem Chromosom 15 lokalisiert (CREWS et al 1982, ADOLPH et al 1987). Um den Bereich der DNA im Genom zu bestimmen, der in den Tumoren amplifiziert vorliegt, wurden Hybridisierungsproben verwendet, die homolog zu Genloci auf dem Chromosom 15 sind (Abb.9, Tab.4).

Bei Mlvi-1 und Mlvi-2 handelt es sich um zwei "Moloney murine leukemia virus (MoMuLV) Integration-sites" (TSICHLIS et al 1983, 1984, 1985, KOZAK et al 1985), die in unterschiedlichen Abständen proximal zum c-myc Gen liegen (Adolph et al subm.). Das c-sis Protooncogen befindet sich distal zum c-myc Protooncogen (KOZAK et al 1983, ADOLPH et al 1987).

Für die Tumoren der Transplantatlinie TV wurde zusätzlich zur Amplifikation des c-myc Genortes, eine Amplifikation des Mlvi-1 Locus festgestellt (Tab.8IV, Abb.4IV, 8III, 10AII). Die Genorte Mlvi-2 und c-sis auf dem Chromosom 15 waren nicht amplifiziert (Abb.10AI,AIII).

Wie für das c-myc Gen, war das normale SacI-Fragment des Mlvi-1 Locus bei allen Tumorgenerationen der Linie TV amplifiziert (Abb.10AII, 7,0 kb). Entsprechend den Tumorgenerationen von 1974-1985, zeigten auch die einzelnen Individuen einer Generation eine Amplifikation des EcoRI-

Fragments des Mlvi-1 Locus (Abb.4IV.II, 10,5 kb). Die Amplifikation des Mlvi-1 Locus in den Tumoren TV war schwächer, als die des c-myc Gens (Abb.4I.IV, 7I.III, 8I.III, Tab.8).

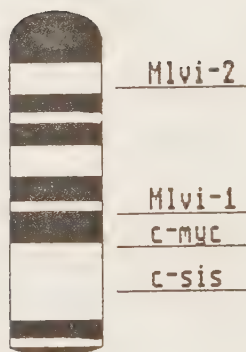


Abb.9: Chromosom 15 der Maus (*Mus musculus*) mit den Loci Mlvi-2, Mlvi-1, c-myc und c-sis (CREWS et al 1982, KOZAK et al 1983, 1985, TSICHLIS et al 1984, ADOLPH et al 1987, subm.).

Abb.10: Vergleich der Restriktionsenzymanalysen der Loci Mlvi-2, Mlvi-1 und c-sis in den Tumorgenerationen von 1974-1985 der Linie TV (A.) und in Primärtransplantaten OTS aus strahleninduzierten Osteosarkomen der NMRI Maus (B.).

Die DNA der Kontrollen, sowie der 6 Tumorgenerationen und der 8 Primärtransplantate wurde nach dem SacI-Verdau aufgetrennt und geblottet. Die Hybridisierungen erfolgten mit DNA-Proben des Chromosoms 15. Die Autoradiographien sind in der Reihenfolge der Genorte vom Zentromer zum Telomer des Chromosoms

I. A

1 2 3 4 5 6 7

23.6

9.6

B

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

II

6.6

III

9.6

6.6

4.3

angeordnet. I. Mlvi-2 Probe pTS10, Expositionszeit 10 Tage (A.) und 22 Tage (B.). II. Mlvi-1 Probe pTS26P/P, Expositionszeit 4 Tage (A.) und 8 Tage (B.). III. v-sis Probe pC60, Expositionszeit 4 Tage (A.) und 2 Tage (B.).

A. (1) NMRI Leber, (2) TV318, (3) TV385, (4) TV144, (5) TV159, (6) TV40, (7) TV209. Längenstandard LSH (kb).

B. (1) OTS7, (2) OTS9, (3) OTS11, (4) OTS12 Tumorgewebe, (5) OTS12 Muskelgewebe, (6) OTS19 Tumor, (7) OTS19 Muskel, (8) OTS27, (9) OTS35/1, (10) OTS36, (11) NMRI Leber. Längenstandard LSH (kb).

In den Tumoren TV waren für die Loci Mlvi-2 (Abb.10AI, SacI 13,5 kb; Abb.4V, EcoRI 4,5 kb) und c-sis (Abb.10AIII, SacI 10,5 kb, 5,9 kb, 3,9 kb), im Vergleich zur NMRI Kontroll-DNA, keine Amplifikation des jeweiligen Genortes feststellbar (s.auch Abb.3BII, 4II). In allen TV-Tumoren war im c-sis Gen und im Mlvi-2 Locus kein Rearrangement zu beobachten.

Für die Primärtransplantate OTS der NMRI-Osteosarkome (Tab.1C) wurden, analog zum Osteosarkom der Transplantatlinie TV, nur für die beiden Tumoren eine Amplifikation des Mlvi-1 Locus gefunden, die ein amplifiziertes (r)c-myc Gen aufwiesen (Abb.6III, 7III, 10BII). In den Tumoren OTS35/1 und im OTS95/1 war der normale Mlvi-1 Locus amplifiziert (Abb.7III, 10BII).

Bei den Primärtransplantaten OTS35/1 und OTS95/1 war, im Gegensatz zum Tumor TV, der Mlvi-1 Locus stärker als das c-myc Gen amplifiziert (Abb.8I,III).

Das untersuchte Primärtransplantat OTS35/1 wies einen normalen, nicht amplifizierten Mlvi-2 und c-sis Locus auf (Abb.10BI,III, s.auch Abb.5II).

3.4. Expression des c-myc Oncogens in murinen, strahleninduzierten Osteosarkomen

SCHWAB et al (1985) wiesen eine 5 bis 25-fach erhöhte Expression des amplifizierten c-myc Gens in Zelllinien eines murinen Osteosarkoms nach. Der Tumor der Transplantatlinie TV (NMRI) und Primärtransplantate OTS (NMRI und Balb/c), für die eine Amplifikation des c-myc Gens nachgewiesen worden war (s.3.2.), wurden auf die Expression des c-myc Oncogens untersucht (Abb.11). Diese Tumoren wurden mit Kontrollgeweben und mit Osteosarkomen ohne c-myc Amplifikation verglichen.

In den untersuchten Tumoren mit amplifizierten c-myc Gen war die Expression größer als im Kontrollgewebe (Abb.11A, Tab.9). Die Expressionshöhe war im Tumor TV389/1 stärker als in den Primärtransplantaten (ca. 25-fach). Tumoren, ohne amplifiziertes c-myc Gen, wiesen eine normale Expression auf. Von den Kontrollgeweben wurde im Embryo (Balb/c) und im Thymus (NMRI) das c-myc Gen normal transkribiert (Abb.11AI, Tab.9). In der Balb/c- und der NMRI-Leber war auch nach längerer Expositionszeit (8 Tage) keine Expression des c-myc Protooncogens zu beobachten. Alle Tumoren und Kontrollgewebe, die das c-myc Gen exprimierten, zeigten eine normale mRNA von 2,3 kb. Abb.11BI zeigt die Auftrennung der RNA im Northern Blot nach der Hybridisierung mit pSVc-myc 1 (Tab.4). Die Hybridisierung mit der Actin-Probe (p λ Hac-69A, Tab.4) als RNA-Mengenkontrolle, wird in Abb.11BII dargestellt. Wie im Slot Blot (Abb.11AI), war im Northern Blot in der Leber keine mRNA des c-myc Gens feststellbar.

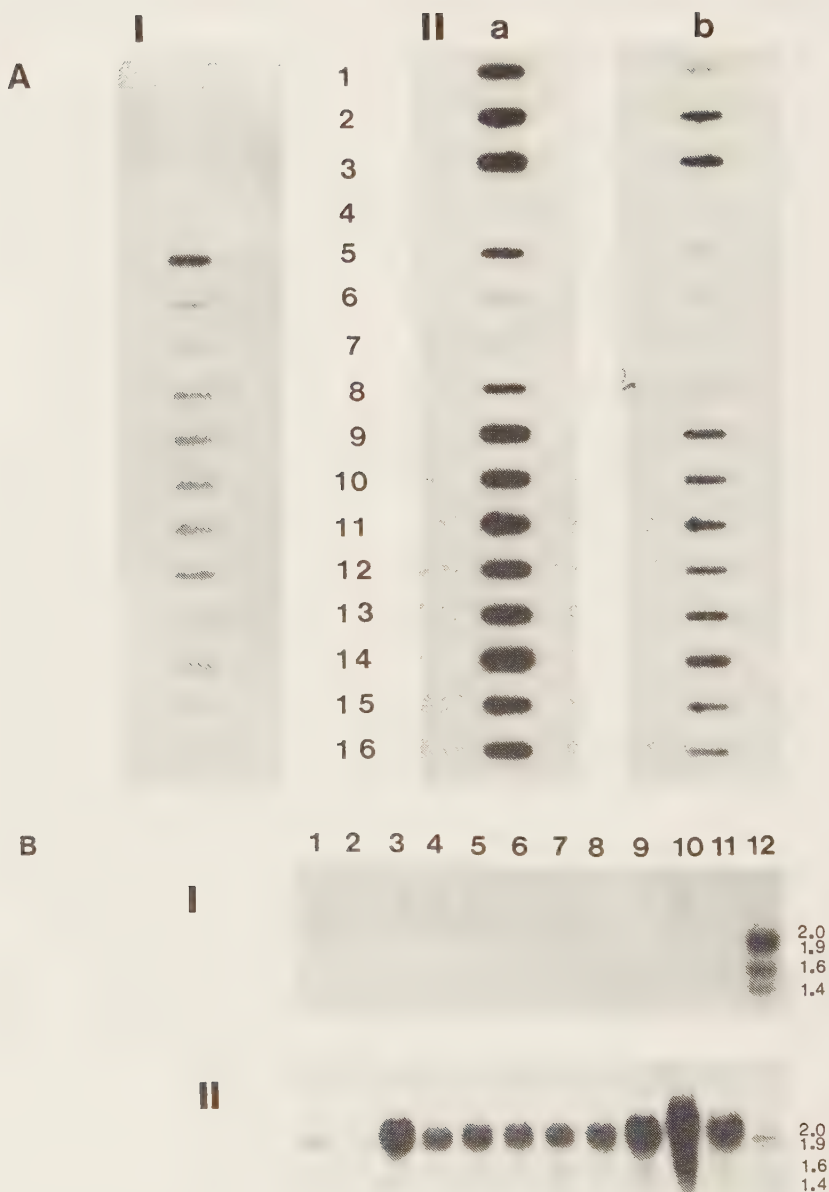


Abb.11: Expression des c-myc Oncogens in Osteosarkomen der NMRI- und der Balb/c-Maus.

A. Gesamt-RNA aus 10 Osteosarkomen (Slot 5-16) der NMRI- und der Balb/c-Maus und aus 4 Kontrollgeweben (1-4), wurde im Slot-Blot auf die Membran übertragen. Vom Tumor TV389/1 wurde eine Verdünnungsreihe der

	Slot	Expression	Gen-Amplifikation
Leber	1	—	—
Embryo	2	1	—
Thymus	3	1	—
Leber	4	—	—
TV389/1	5	25	+
	6	28	
	7	29	
OTS35/1	8	6	+
OTS60	9	3	+
OTS69	10	3	+
OTS70	11	2	+
OTS73	12	2	+
OTS78	13	1	—
OTS79	14	1	—
OTS82	15	1	—
OTS83	16	1	—

Tab.9: Expressionshöhe des c-myc Oncogens in Osteosarkomen der Maus und Korrelation mit der Amplifikation des Gens im Tumor.

Die Expressionshöhe der RNA wurde mit dem Densitometer bestimmt (2.11.). Dafür wurde die Autoradiographie der Hybridisierung mit pSVc-myc 1 verwendet (Abb.11AI). Für die Normierung diente die Autoradiographie der Hybridisierung mit der Actin Probe p λ Hac-69A (Abb.11AIIa). Balb/c (1), (2), (9)–(16); NMRI (3)–(8).

RNA aufgetragen (5–7). I. Nach der Hybridisierung der Membran mit pSVc-myc 1 wurde 20 h exponiert. II. Die Hybridisierung mit der Actin Probe (p λ Hac-69A) diente für die Normierung der aufgetragenen RNA-Menge. Expositionszeit 20 h (a.) und 4 h (b.).

Balb/c (1), (2), (9)–(16); NMRI (3)–(8).

(1) Leber, (2) Embryo, (3) Thymus, (4) Leber; (5)+(6)+(7) TV389/1 10 μ g – 1 μ g – 0,5 μ g Gesamt-RNA/Slot; (8) OTS35/1, (9) OTS60, (10) OTS69, (11) OTS70, (12) OTS73, (13) OTS78, (14) OTS79, (15) OTS82, (16) OTS83.

B. Die Gesamt-RNA der Tumoren (Spur 1–8) und der Kontrollgewebe (9–11) wurde in der Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach dem Northern Blot wurde hybridisiert. I. Probe pSVc-myc 1, Expositionszeit 20 h. II. Actin Probe p λ Hac-69A, Expositionszeit 20 h.

NMRI (1), (2), (9); Balb/c (3)–(8), (10)–(11).

(1) TV389/1, (2) OTS35/1, (3) OTS60, (4) OTS69, (5) OTS70, (6) OTS78, (7) OTS82, (8) OTS83, (9) Thymus, (10) Embryo, (11) Leber, (12) Längenstandard LSIII (kb).

4. Die Transplantatlinie TV als Beispiel für das Rearrangement des c-myc Oncogens in murinen Osteosarkomen

Das Osteosarkom der Transplantatlinie TV, das 1973 mit ^{224}Ra induziert worden war (Tab.1A), zeigte im Untersuchungszeitraum 1974-1985 ein stabiles Rearrangement des amplifizierten c-myc Oncogens (3.2.1.). Im Tumor der Linie TV wurde außerdem die stark erhöhte Expression der c-myc mRNA festgestellt (3.4.). Aus diesem Grund wurde das Osteosarkom der Linie TV (NMRI) als Beispiel für das Rearrangement des c-myc Protooncogens im Tumor gewählt.

Zwei klonierte EcoRI/EcoRI-Fragmente mit myc-spezifischen Sequenzen des Tumors TV389/1 wurden kartiert. Als Vergleich des rearrangierten rc-myc Gens diente die Karte des c-myc Protooncogens der NMRI Maus.

Für die NMRI Kontroll-Maus aus der GSF-Zucht wurde eine eigene Restriktionskarte des normalen c-myc Protooncogens erstellt (Abb.12II). Dabei wurden drei c-myc spezifische Hybridisierungsproben verwendet, die - außer zum 1. Intron - mit dem gesamten Bereich des c-myc Protooncogens hybridisieren (Tab.4).

Als Vergleich dienten die Sequenzierungsdaten des Gens und konventionell erstellte Restriktionskarten (BERNARD et al 1983, STANTON et al 1984, EMBL-Datenbank, YANG et al 1985, Balb/c Maus). Es wurden nur geringfügige Unterschiede in der c-myc Karte des NMRI-Stammes der GSF Neuherberg zu der der Balb/c-Maus gefunden (Abb.12I,II).

Um einen Restriktionsenzymfragmentlängen-Polymorphismus RFLP des c-myc Genortes der NMRI Maus weitgehend auszuschließen, wurde ein Vergleich der Restriktionsenzymfragmentmuster von mehreren Individuen durchgeführt. Zwischen 5 NMRI-Mäusen und 1 Balb/c-Tier zeigten sich keine Unterschiede im Restriktionsenzymfragmentmuster des c-myc Gens mit den Enzymen BamHI+EcoRI (5,6 kb) und XhoI+EcoRI (12,2 kb und 4,0 kb) mit der Probe pSVc-myc 1.

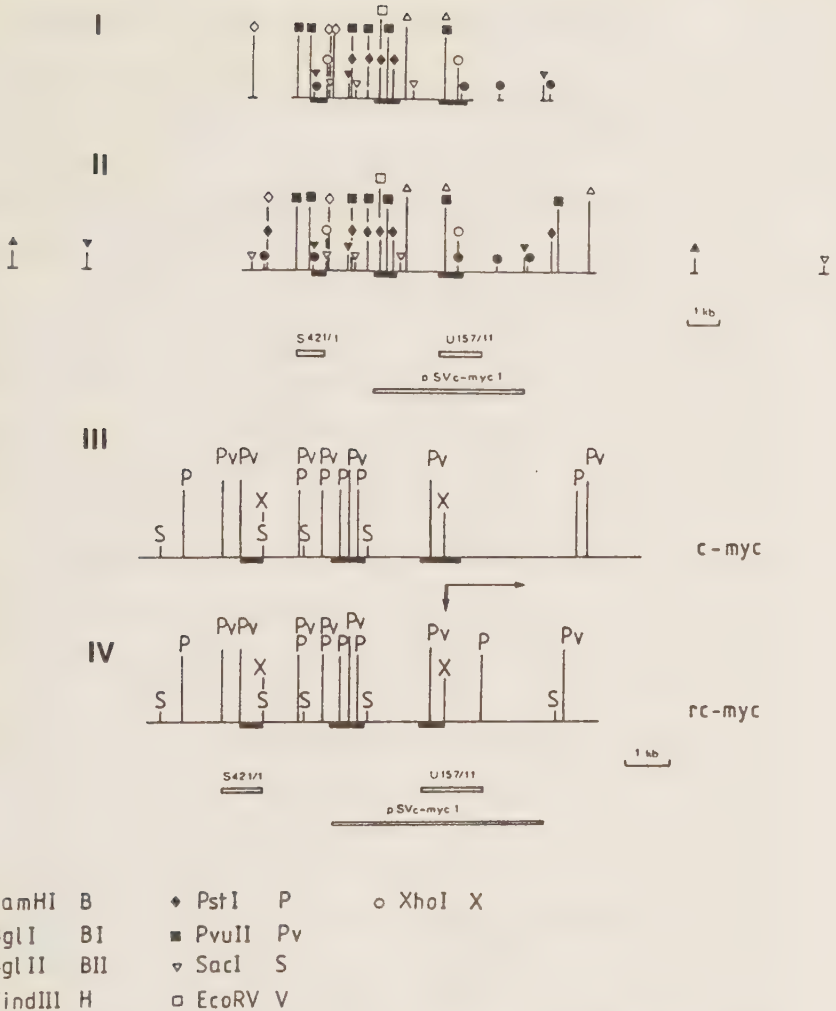


Abb.12: Restriktionskarten des c-myc Protooncogens der Maus (Mus musculus) und des rc-myc Oncogens des Tumors TV389/1.

In den Karten des c-myc Protooncogens (I-III) und des rc-myc Oncogens (IV) sind die drei Exons eingezeichnet (schwarze Balken). Die verwendeten DNA-Proben S421/1, pSVc-myc 1 und U157/11 sind als offene Balken gekennzeichnet. Die durchgezogene Linie der Karte gibt den vollständig kartierten Bereich an.

I. Karte des c-myc Gens aus Daten der Sequenzierung und aus konventionell erstellten Karten (BERNARD et al 1983, YANG et al 1985). II. Karte, erstellt durch Restriktionsenzymanalysen der DNA aus NMRI-Mäusen der GSF Neuherberg. III. Karte des c-myc Gens von II. mit den Enzymen SacI, PstI, PvuII und XhoI. IV. Karte des klonierten rc-myc Gens des Tumors TV389/1 mit den Enzyme von III.. Pfeil: Bruchstelle im 3. Exon und fremder 3' Nachbarbereich.

4.1. Untersuchung der klonierten rc-myc Sequenzen des TV389/1

4.1.1. Einteilung der klonierten E/E-Fragmente des TV389/1 in die Typen I und II

Um das Rearrangement des c-myc Gens im Osteosarkom der Linie TV genauer bestimmen zu können, wurden die myc-spezifischen 20 kb EcoRI/EcoRI-Fragmente kloniert und kartiert.

Für das Screening der angereicherten Genbank nach pSVc-myc 1-positiven Klonen (2.7.), wurden nach der Replikation der rekombinierten EMBL3A-Phagen mehrere Plaques pro Platte gepickt. Nach 4 Reinigungsschritten zur Isolierung der positiven Klone, wurde von 16 Klonen die DNA nach der λ -Schnellpräparation gewonnen.

Nach der Isolierung der Klone schloß sich die Identifizierung an. Für die Kartierung wurde als erstes die Restriktionsenzymanalyse mit BamHI (B/B) und die folgenden hoch-stringenten Hybridisierungen durchgeführt (Proben Tab.4).

Die Probe pSVc-myc 1 zeigte, daß alle positiven Klone ein 7,8 kb großes myc-spezifisches B/B-Fragment enthielten (Abb.13II).

Mit Hilfe des Gelfotos der Restriktionsenzymanalyse ließen sich bei den komplett verdauten 14 pSVc-myc 1-positiven Klonen 2 unterschiedliche Typen an Restriktionsenzymmustern erkennen (Abb.13I). Dem B/B-Typ I wurden die Klone 1, 7, 8, 11, 1/3, 5/3 und 10/3 zugerechnet, dem B/B-Typ II die Klone 1/2, 3, 4, 5, 6, 10 und 9/3.

Um alle Insert-spezifischen Sequenzen in der Autoradiographie sichtbar zu machen, wurden je eine Hybridisierung mit dem Klon 8 des B/B-Typs I (Abb.13III) und dem Klon 1/2 des B/B-Typs II (Abb.13IV) durchgeführt. Für die Nick-Translation wurde dabei jeweils der gesamte rekombinierte Phage eingesetzt, deswegen sind in Abb.13III,IV die λ -Arme zu erkennen (5' 19,4 kb und 3' 9,2 kb). Da BamHI eine Enzymschnittstelle im Polylinker des EMBL3A-Phagen besitzt, wurden bei der

Restriktionsenzymanalyse beide λ -Arme vom Insert abgetrennt.

Tab.10 stellt für die Typen I und II des BamHI-Restriktionsenzymmusters, die Anzahl und die Größe der B/B-Fragmente aufgrund der Abb.13III,IV dar. Jeder Typ wies bei der Hybridisierung mit sich selbst 5

B/B-Fragmente auf, die in drei Gruppen eingeteilt werden konnten.

Die Fragmente der Gruppe 1, 2, 4 und 5, waren bei beiden B/B-Typen I und II vorhanden. Nur das B/B-Fragment 2 des Typs I und II war pSVc-myc 1-positiv.

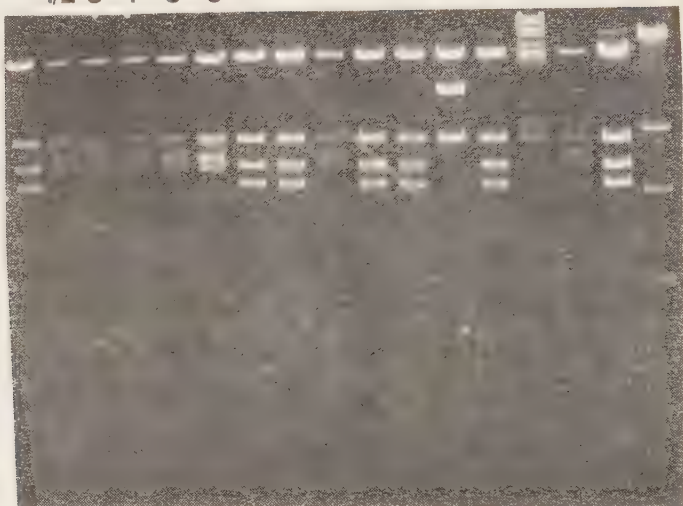
Zur Gruppe 2 gehörten die Fragmente 1 und 3 mit den Längen 8,1 kb (Typ II) und 6,9 kb (I). Diese Fragmente hybridisierten mit beiden Proben, Klon 8(I) und Klon 1/2(II), sie mußten zumindest in einem kleinen Bereich (ca. 50-200 bp) zum anderen B/B-Typ homolog sein.

Zur Gruppe 3 sind die typenspezifischen B/B-Fragmente 6(II) und 7(I) zuzurechnen, die ausschließlich bei einem Typ vorkamen.

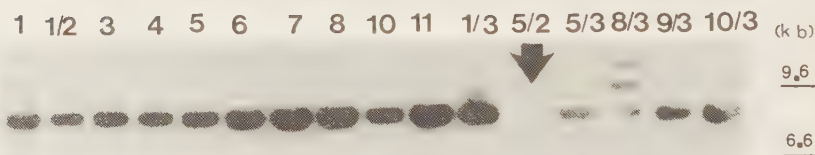
Die Einteilung der 14 Klone in die B/B-Typen I und II wurde durch die Restriktionsenzymanalysen HindIII/HindIII+EcoRI und BglII/BglII+EcoRI überprüft. Beide Analysen bestätigten die Einteilung der Klone in die B/B-Typen I und II, zusätzliche Typen waren nicht zu beobachten. Abb.13V zeigt die Analyse HindIII+EcoRI, hybridisiert mit der Probe Klon 10(II). Das Enzym EcoRI, ein Polylinker-Enzym des λ -Phagen, wurde bei der Klonierung der c-myc Sequenzen des Tumors TV389/1 verwendet. Deshalb schnitt es nicht im Insert, es trennte die λ -Arme ab. Da die Probe Klon 10(II) nur aus dem isolierten E/E-Fragment bestand, leuchteten bei dieser Hybridisierung die EMBL3A-Arme nicht auf.

Von den 14 positiven Klonen wurden pro B/B-Typ 2 Klone, mit jeweils unterschiedlicher Orientierung im EMBL3A-Phagen, 7 zusätzlichen Restriktionsenzymanalysen in Kombination mit EcoRI unterzogen. Repräsentativ für den B/B-Typ I wurden die Klone 1 und 7, für den B/B-Typ II die Klone 4 und 9/3 verwendet. In keiner der 10 Analysen

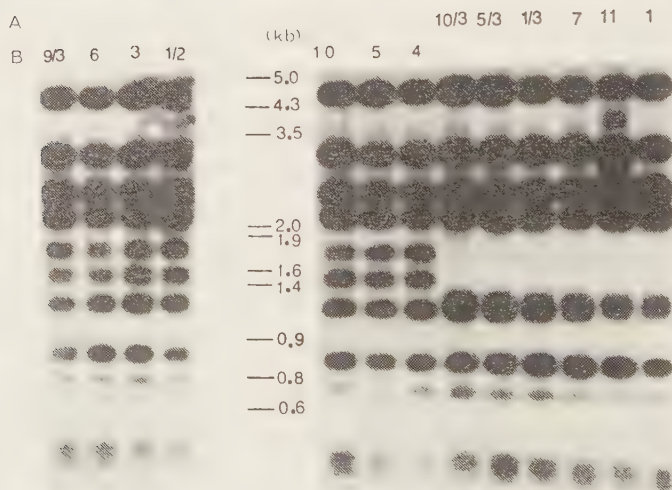
I A 1 7 8 11 1/3 - 5/3 - 10/3
B 1/2 3 4 5 6 10 - - 9/3 LS II



II 1 1/2 3 4 5 6 7 8 10 11 1/3 5/2 5/3 8/3 9/3 10/3 (k b)
9.6
6.6



V



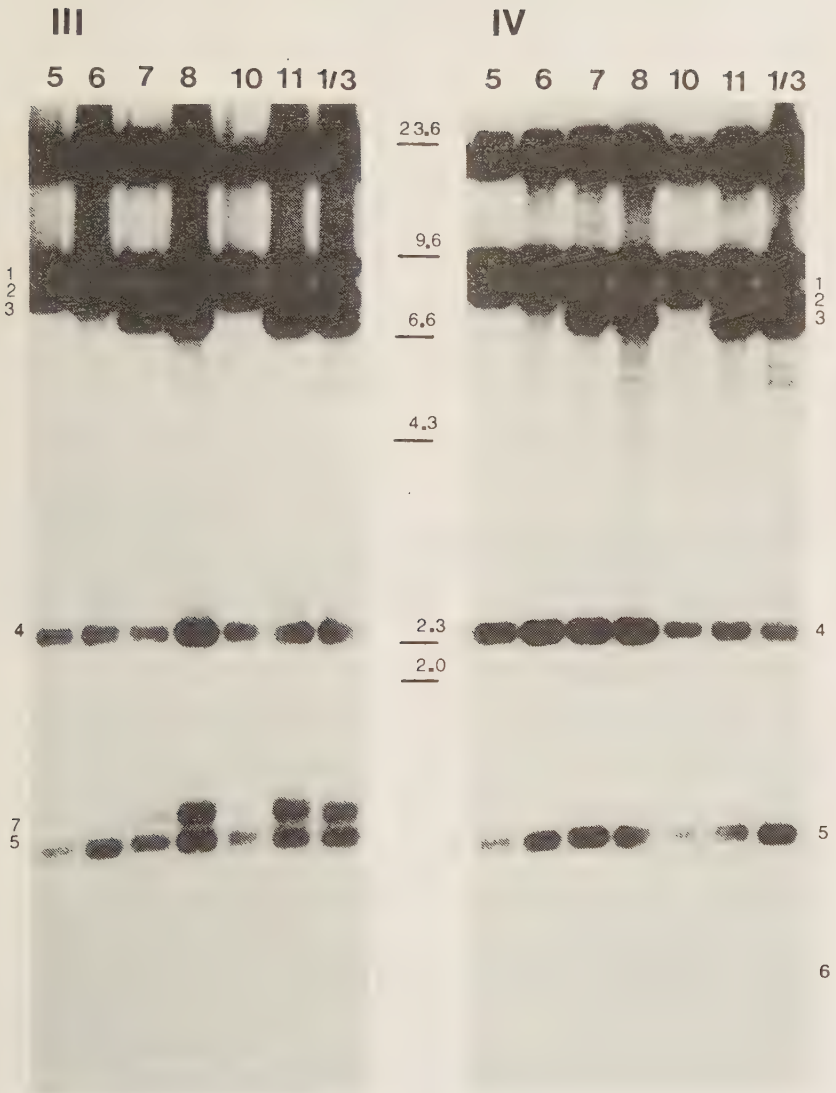


Abb.13: Restriktionsenzymanalyse der rekombinierten EMBL3A-Phagen. Die DNA der rekombinierten EMBL3A-Phagen wurde mit BamHI (I-IV.) und mit HindIII+EcoRI (V.) verdaut. Die Fragmente wurden in der Gelelektrophorese aufgetrennt (I.) und geblottet. Danach erfolgten die Hybridisierungen II.-V.. Fortsetzung S.71 unten.

wurde ein Unterschied im Restriktionsenzymmuster der Klone eines Typs gefunden. Im weiteren Text wird nur noch zwischen Klonen vom Typ I und vom Typ II unterschieden.

Die Addition der 5 B/B-Fragmente eines Typs (Tab.10) zeigte, daß 2 verschieden lange E/E-Fragmente von 19,6 kb (I) und von 20,2 kb (II) kloniert worden waren. Um die Restriktionsenzymfragment-Kartierung der ca. 20 kb großen E/E-Inserts eines Typs zu erleichtern, wurden jeweils die 5 B/B-Fragmente im pUC19-Plasmid subkloniert.

4.1.2. B/B-Subklone der E/E-Fragmente des Typs I und II

Die Subklonierung des E/E-Fragments des Typs I und II führte jeweils zu 5 Subklonen (Tab.10, 11). Damit enthielt jeder Subklon ein B/B-DNA-Insert aus einem pSVc-myc 1 positiven EcoRI-EcoRI-Gesamtabschnitt des Tumors TV389/1. Aufgrund der Insert-Größen und der Hybridisierung mit verschiedenen DNA-Proben (Tab.4), wurden die einzelnen Subklone des Typs I und II unterschieden und identifiziert.

1. Mit den spezifischen Proben Klon 11(I) und Klon 10(II) wurden die Subklone in die drei Gruppen der Tab.10 eingeteilt. Subklone der Gruppe 1, die aufgrund ihrer Größe und der Hybridisierung zu beiden Typen zugerechnet wurden, konnten ohne weitere Analyse nicht als identisch in ihrer Sequenz bewertet werden.

2. Die drei Proben {1. Exon}, {2. Exon - 2. Intron - 3. Exon - 3' Nachbarsequenzen} und {3. Exon}, identifizierten Subklone mit c-myc homologen Bereichen.

Tab.11 zeigt die Einteilung und die Bezeichnung der isolierten B/B-Subklone des Typs I und II und weitere Charakteristika. Die Zuteilung der Subklone in eine bestimmte Fragmentgrößen-Gruppe erfolgte nicht nur aufgrund der Größe und der Hybridisierungen. Das mit der Restriktionsenzymanalyse PvuII+BamHI entstandene Restriktionsenzymmuster der kleinen Fragmente, erleichterte die Zuordnung der Subklone.

B/B-Typ I B/B-Typ II

$\Sigma = 19,6 \text{ kb}$ $\Sigma = 20,2 \text{ kb}$

B/B-Fragment	Größe (kb)	Hybridisierungen mit				Gruppe
		I	II	I	II	
1	8,1	-	-	+	+	2
2	7,8	+	+	+	+	1
3	6,9	+	+	-	-	2
4	2,3	+	+	+	+	1
5	1,2	+	+	+	+	1
6	0,8	-	-	-	+	3
7	1,4	+	-	-	-	3

Tab.10: Fragmente des E/E-Gesamtabschnittes Typ I und Typ II nach Restriktionsenzymverdaul mit BamHI.

Die klonierten E/E-Abschnitte Typ I und Typ II wurden der Analyse mit BamHI unterzogen und hybridisiert. Die Hybridisierungsproben waren für Typ I Klon 11(I), für Typ II Klon 10(II). Die B/B-Fragmente der beiden Typen wurden aufgrund ihrer Größe (kb) und ihrer Hybridisierungssignale in 3 Gruppen eingeteilt.

Fortsetzung S.69.

I. Gelfoto der 16 Klone nach BamHI-Verdaul. Einteilung der Klone aufgrund des Restriktionsenzymfragmentmusters in den B/B-Typ I (A.) und den B/B-Typ II (B.).

II. Hybridisierung der Klone 1, 1/2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 1/3, 5/3, 8/3 (partiell verdaul), 9/3 und 10/3 mit pSVc-myc 1. Expositionszeit 4 h. λ -Klon 5/2 (Pfeil) besaß kein c-myc homologes Insert.

III. Hybridisierung von 7 Klonen mit der Probe Klon 8 des B/B-Typs I. Daraus resultierten die BamHI-Fragmente 1, 2, 3, 4, 5 und 7. Expositionszeit 3 Tage.

IV. Hybridisierung der 7 Klone mit der Probe Klon 1/2 des B/B-Typs II. Die Fragmente 1, 2, 3, 4 und 5 waren nach der Expositionszeit von 3 Tagen sichtbar, das Fragment 6 erst nach Überexposition von 8 Tagen deutlich. Längenstandard LSII (kb).

V. Restriktionsenzymanalyse von 13 rekombinierten EMBL3A-Phagen des Typs I (A.) und II (B.) mit HindIII+EcoRI. Hybridisierung mit Klon 10(II), Expositionszeit 2 Tage. Der Klon 11 war nicht komplett verdaul. Längenstandard LSIII (kb).

B/B-Fragment	1	2	3	4	5	6	7
kb	8,1	7,8	6,9	2,3	1,2	0,8	1,4
Typ I	/	II3	I9 ★ II2 II7★ I21	II-17 II0 II1 II6 I20 I24 I51	I8 I9 ★ II7★ II8 I22	/	II7★
S421/1		-	+	-	+		-
U157/11		+	-	-	-		-
pSVc-myc 1		+	-	-	-		-
Gruppe 3		-	-	-	-		+
Typ II	II12★ II23	II2 II6 II11 II16 II21	/	II9 II14 II17	II7 II8 II15 II18 II19	II12★ II20 II66	/
S421/1	+	-		-	+	-	
U157/11	-	+		-	-	-	
pSVc-myc 1	-	+		-	-	-	
Gruppe 3	-	-		-	-	+	

★ pUC19-Subklon mit 2 bzw. 3 B/B-Inserts
 Gruppe 3: typenspezifisches Randfragment

DNA-Proben:

S421/1 1. Exon
 U157/11 3. Exon
 pSVc-myc 1 2. Exon - 3' Nachbarsequenzen

Tab.11: Rekombinierte pUC19-Subklone mit BamHI DNA-Insert des E/E-Gesamtabschnittes Typ I und II.
 Die Subklone sind geordnet nach Typ I und Typ II, sowie nach ihrer Fragmentgröße (kb). Weitere Charakteristika sind die Hybridisierungen mit den myc-spezifischen DNA-Proben S421/1, U157/11 und pSVc-myc 1, sowie die typenspezifische Hybridisierung (Gruppe 3).

4.2. Kartierung der Restriktionsenzymchnittstellen der E/E-Fragmente Typ I und II

Bei der Kartierung wurden die Restriktionsenzymchnittstellen auf dem E/E-Gesamtabschnitt Typ I und Typ II des Tumors TV389/1 bestimmt. Da die myc-spezifischen Sequenzen der E/E-Fragmente rearrangiert waren, konnte kein Vergleich mit der Karte der NMRI Kontroll-DNA stattfinden. Rearrangements einer DNA-Sequenz bewirken Veränderungen der Restriktionsenzymchnittstellen und damit im Vergleich zur Keimbahn-DNA ein verändertes Restriktionsenzymfragmentmuster.

Der Ablauf der Analyse war identisch mit der Kartierung einer unbekannten DNA-Sequenz. Die beiden E/E-Fragmente Typ I und Typ II wurden unabhängig voneinander kartiert. Es wurden jeweils die enzyspezifischen, äußeren und zentralen Fragmente voneinander unterschieden und ihre Lokalisation bestimmt.

4.2.1. Identifizierung der äußeren und der zentralen Fragmente

Die Identifizierung enzyspezifischer Randfragmente wird an einem Beispiel erläutert (Abb.14).

Zur Identifizierung der enzyspezifischen Randfragmente der beiden E/E-Inserts (Tab.12) und der B/B-Subklone, wurde die DNA von Insert+Vektor mit einem Restriktionsenzym im Einzelverdau geschnitten. Im Doppelverdau wurde als 2. Endonuklease das "Klonierungsenzym" mit der Schnittstelle im Polylinker benützt (Klon EcoRI; Subklon BamHI). Dadurch wurden insertspezifische Fragmente vom Vektor abgetrennt und konnten durch den Vergleich mit dem Einzelverdau identifiziert werden. Diese Fragmente stellten die beiden enzyspezifischen Randfragmente dar. Lag jedoch die Schnittstelle des 1. Enzyms zu nahe an der des Polylinkerenzyms (< 200 bp), war ein Randfragment mit dieser Methode nicht mehr zu identifizieren. Dies war auch dann der Fall, wenn das

1. Enzym im Polylinker des Vektors schnitt.

Die Analyse wurde wesentlich vereinfacht durch die Verwendung der isolierten E/E-Fragmente als Hybridisierungsproben (Klon 11(I) und Klon 10(II), Tab.4).

Die Methode wird nun an dem Beispiel Insert+Vektor = E/E-Fragment Typ I im EMBL3A mit der Analyse EcoRV/EcoRV+EcoRI (V/V+E) für den Klon, und für Insert+Vektor = B/B-Fragment 2 im pUC19 mit EcoRV/EcoRV+BamHI (V/V+B) für den Subklon erläutert (Abb.14).

Aus der Restriktionsenzymanalyse des rekombinierten linearen EMBL3A-Phagen mit EcoRV, resultierten 4 verschiedene Fragmente: 29,8 kb, 12,5 kb, 3,7 kb und 2,2 kb (Abb.14I). Der Doppelverdau EcoRV+EcoRI ergab 6 Fragmente: 19,4 kb (5' EMBL3A-Arm), 10,4 kb (Randfragment), 9,2 kb (3' EMBL3A-Arm), 3,7 kb, 3,3 kb (Randfragment) und 2,2 kb. Die beiden Randfragmente wurden durch die Hybridisierung mit Klon 11(I) von den λ -Armen, die nicht aufleuchteten, unterschieden. Die Anordnung der beiden inneren V/V-Fragmente war erst nach der Subklonierung und weiteren Enzymanalysen möglich (s.4.2.2.).

Die Restriktionsenzymanalyse des zirkulären rekombinierten pUC19-Plasmids mit EcoRV führte zu 3 Fragmenten: 5,6 kb, 3,7 kb und 2,2 kb (Abb.14II). Der Doppelverdau EcoRV+BamHI trennte das pUC19-Plasmid von 2,7 kb von den insertspezifischen Randfragmenten von 0,9 kb und 1,0 kb ab (Position der inneren Fragmente von 3,7 kb und 2,2 kb s.4.2.2.). Die insertspezifischen 4 Fragmente des B/B-Subklons wurden ebenfalls mit der Hybridisierungsprobe Klon 11(I) vom Plasmid unterschieden.

Die Randfragmente der einzelnen Enzymanalysen der λ -Klone, konnten zum Teil nach ihrer Zugehörigkeit zur Gruppe 3 charakterisiert werden. Tab.12 zeigt, daß die Gruppe 3-spezifischen Randfragmente ausschließlich dem Typ II zuzurechnen waren, z.B. EcoRI/XhoI=2,3 kb war nur zur Typ II-spezifischen Probe homolog. Bei den Endonukleasen EcoRV, XhoI, BglI,

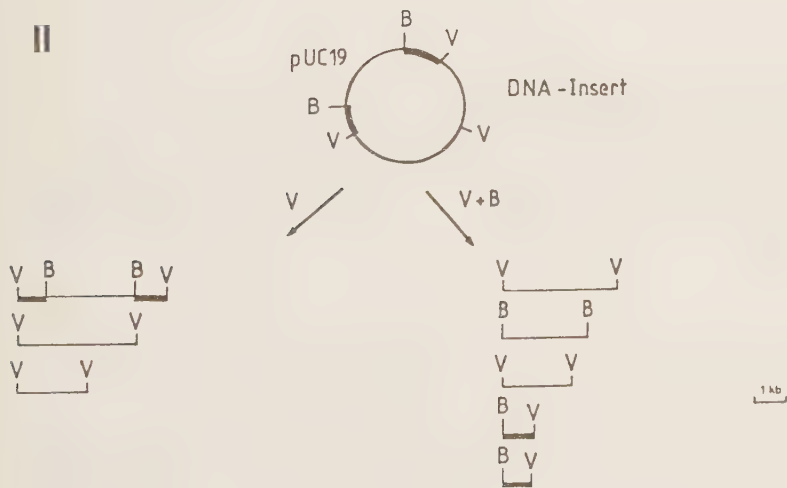
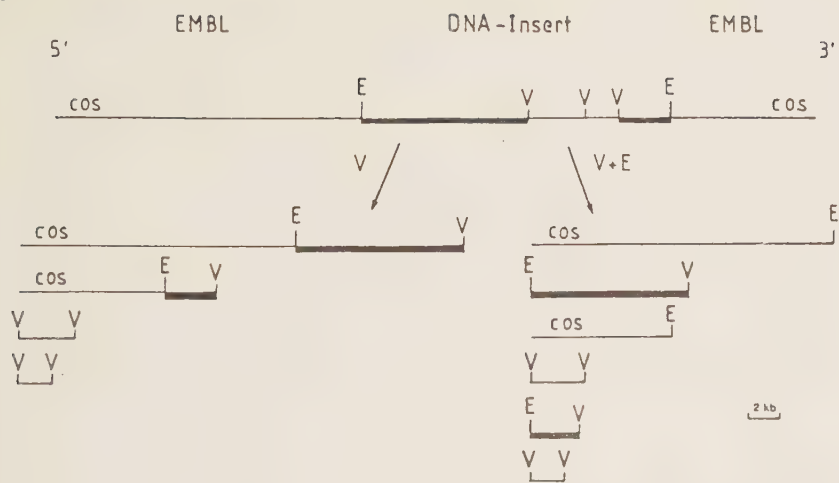


Abb.14: Identifizierung der Randfragmente eines DNA-Inserts.

Die DNA des rekombinierten Vektors wurde mit dem Enzym EcoRV (V) geschnitten. Daraus resultierte nach Auftrennung der Fragmente, ein spezifisches Restriktionsenzymfragmentmuster. Die Identifizierung der beiden Randfragmente (schwarzer Balken) erfolgte durch den Vergleich mit dem Muster des Doppelverdaus EcoRV+EcoRI (V+E) bzw. EcoRV+BamHI (V+B). I. Das E/E-Insert im linearen EMBL3A-Klon, geschnitten mit EcoRV und EcoRV+EcoRI. II. Das B/B-Insert im zirkulären pUC19-Subklon, geschnitten mit EcoRV und EcoRV+BamHI.

Enzym + EcoRI	Typ I		Typ II	
	(II)		(I) DNA-Proben	
EcoRV	10,4	+	11,0	+
	3,3	+	3,3	+
XhoI	8,7	+	2,3	-
	2,5	+	2,5	+
BglII	?		?	
	2,8	+	2,8	+
BglIII	2,8	+	2,8	+
	2,1	+	2,7	-
HindIII	?		2,0	-
	0,5	+	0,5	+
PstI	6,0	+	6,6	+
	?		?	
PvuII	?		?	
	2,2	+	2,8	-

Tab.12: Identifizierte Randfragmente (kb) der E/E-Klone Typ I und Typ II für die entsprechenden Restriktionsenzymanalysen.

Das E/E-Fragment wurde im Einzelverdau mit dem Enzym geschnitten. Diese Analyse wurde mit der des Doppelverdaus Enzym + EcoRI verglichen. Die DNA wurde mit den Proben Klon 11 (I) und Klon 10 (II) hybridisiert.

+ Signal bei Hybridisierung der DNA mit der DNA-Probe des anderen Typs;
- keine Hybridisierung (Gruppe 3); ? Identifizierung war im Klon nicht möglich.

BglII und HindIII war jeweils ein Fragment identisch für Typ I und II und gehörte nicht zur Gruppe 3, z.B. EcoRI/XhoI=2,5 kb.

Daraus wurde geschlossen, daß der E/E-Abschnitt des Typs I in einem der beiden Randbereiche (mindestens 3,3 kb, EcoRI - EcoRV) identisch war mit dem des Typs II. Dieselbe Orientierung 5'-3' des identischen Abschnitts bei beiden Typen konnte daraus jedoch nicht gefolgert werden.

Ein Vergleich der Gruppe 3-spezifischen Randfragmente von XhoI, BglIII, und PvuII zeigte, daß der zweite Randbereich des E/E-Abschnitts des Typs II innerhalb von ca. 2,8 kb (EcoRI - PvuII) nicht identisch war mit Typ I.

Die Anordnung der zentralen Fragmente auf dem E/E-Gesamtabschnitt, wurde durch parallele Restriktionsenzymanalysen der Klone und der zugehörigen Subklone möglich.

Die DNA des E/E-Klons und der 5 B/B-Subklone wurden jeweils mit dem entsprechenden Enzym verdaut. Ein zentrales Fragment gleicher Größe im Klon und in einem Subklon konnte damit einem bestimmten BamHI/BamHI-Bereich (entspricht Subklon) auf dem E/E-Gesamtabschnitt zugeordnet werden. Für diese Analysen wurden, außer dem Größenvergleich, auch die Hybridisierungen der Klon-Fragmente mit den nicktranslatierten Subklon-DNAs verwendet (Tab.11).

Viele kleine Fragmente eines spezifischen Enzymverdaus ließen sich auch nicht bei Verwendung der überlappenden Hybridisierungsproben auf dem E/E-Gesamtabschnitt lokalisieren. In diesem Fall war nur die Zuordnung zu einem bestimmten B/B-Bereich möglich.

4.2.2. Anordnung der B/B- und der V/V-Fragmente auf dem E/E-Gesamtabschnitt

Für die Kartierung wurde die Anordnung der Fragmente der verschiedenen Restriktionsenzymanalysen auf dem E/E-Gesamtabschnitt bestimmt. Als erstes erfolgte die Lokalisation der 5 B/B-Fragmente und der 4 V/V-Fragmente (Abb.15, Proben Tab.4). Die 5'-3' Orientierung wurde in der folgenden Beschreibung 1.-6. bereits als bekannt vorausgesetzt.

1. Durch die Restriktionsenzymanalyse Sall/Sall+EcoRI (SI/SI+E) wurde das E/E-Fragment in das 5' Fragment verdaut: Typ I 3,0 kb und Typ II 3,6 kb. Der große 3' Abschnitt war bei beiden Typen 16,6 kb. Die entsprechende Sall-Schnittstelle war im B/B-Fragment 3 des Typs I und im B/B-Fragment 1 des Typs II lokalisiert. Die 4 restlichen Subklone jedes Typs wiesen keine Sall-Schnittstelle auf.

2. Für die Analyse EcoRV/EcoRV+EcoRI (V/V+E) wurden die Randfragmente identifiziert, 5': Typ I 10,4 kb, Typ II 11,0 kb und 3': Typ I+II 3,3 kb

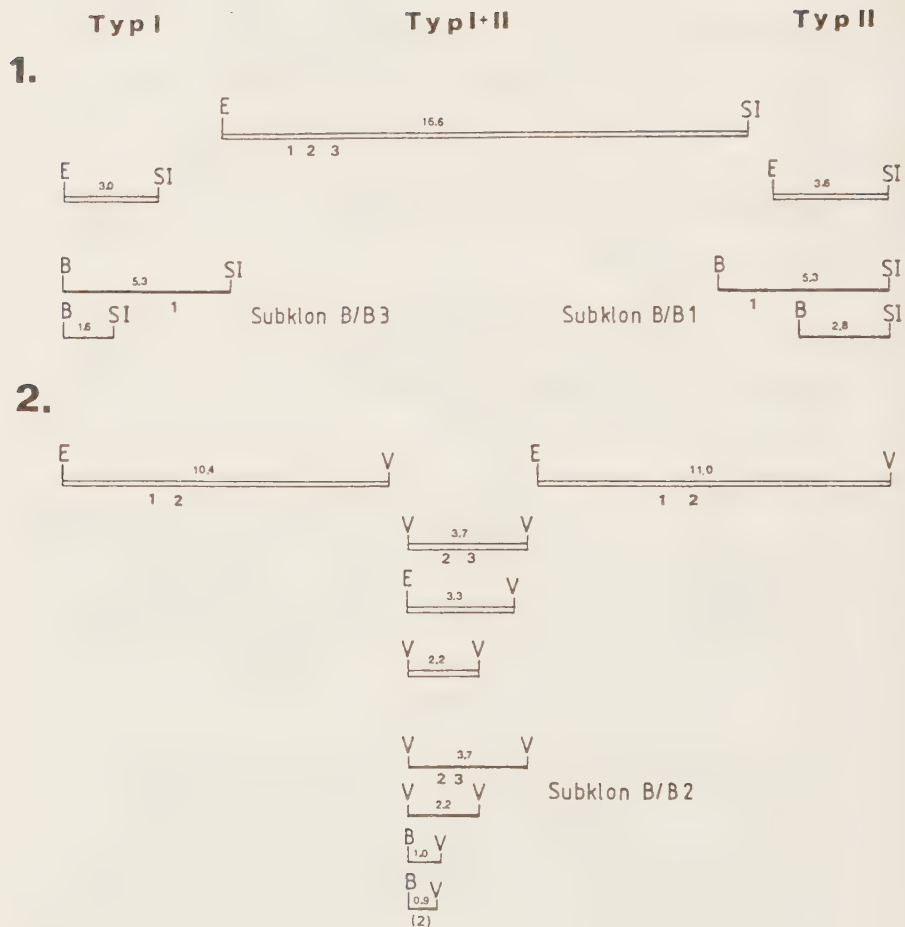
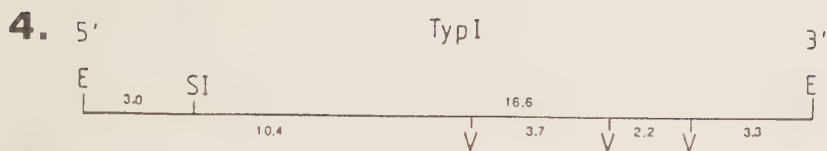


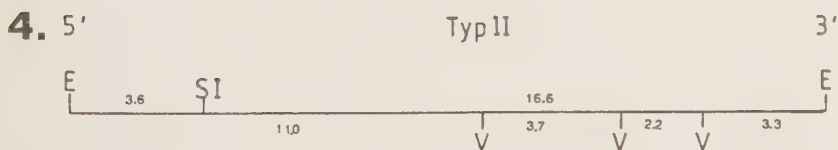
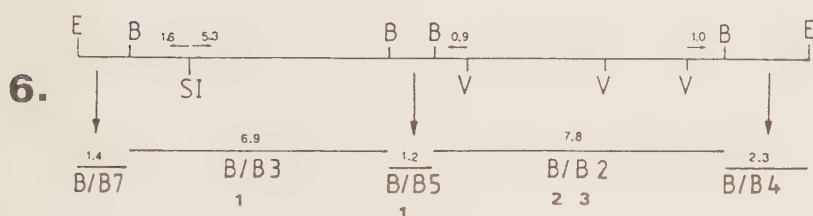
Abb.15: Identifizierung der Anordnung der 5 B/B-Fragmente und der 4 V/V-Fragmente auf dem E/E-Gesamtabschnitt Typ I und Typ II durch die Schritte 1.-6..

Fragmente des Typs I sind links, die des Typs II rechts angeordnet; Fragmente, die bei Typ I+II zu beobachten waren, in der Mitte.

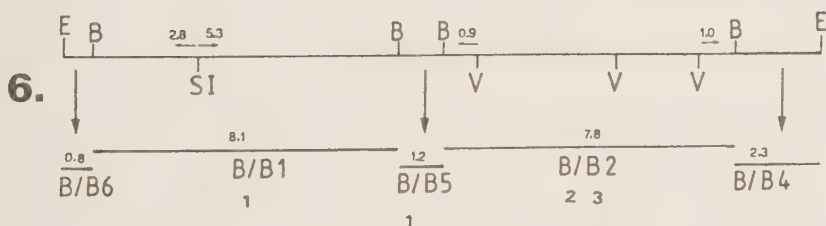
Restriktionsenzymfragmente im E/E-Klon und dem entsprechenden B/B-Subklon durch 1. SalI+EcoRI und SalI+BamHI; und durch 2. EcoRV+EcoRI und EcoRV+BamHI.



5.



5.



3. Hybridisierungen der Klone und Subklone mit den c-myc homologen Proben: (1) S421/1 (1. Exon), (2) pSVc-myc 1 (2.+3. Exon) und (3) U157/11 (3. Exon). Klammer bedeutet schwaches Signal.

4. Anordnung der Sall- und EcoRV-Fragmente auf dem E/E-Gesamtabschnitt Typ I und Typ II. Daraus resultierte 5. die Lokalisation der Fragmente B/B3 und B/B2 für Typ I, B/B1 und B/B2 für Typ II. 6. Durch Identifizierung der Randbereiche (4.3.1., Tab.12), Zuordnung von B/B5 (Typ I+II), B/B7 (Typ I) und B/B6 (Typ II).

(s.Abb.14I, Tab.12). Die beiden inneren Fragmente waren bei beiden Typen gleich groß: 3,7 kb und 2,2 kb. Die Analyse wurde analog mit EcoRV/EcoRV+BamHI bei den Subklonen durchgeführt (Abb.14II). Die entsprechenden Schnittstellen befanden sich im B/B-Fragment 2 Typ I+II.

3. Mit den c-myc homologen DNA-Proben wurden für die Restriktionsenzymanalysen SalI und EcoRV, in Kombination mit EcoRI und BamHI, die positiven Fragmente des Klons und der Subklone identifiziert. Die Hybridisierung mit Klon 11(I) und Klon 10(II) ergab für beide Analysen keine typenspezifischen Fragmente der Gruppe 3.

4. Aus 1.-3. resultierte die Anordnung der EcoRV-Fragmente auf dem E/E-Gesamtabschnitt, mit der Annahme, daß das 2. und das 3. Exon in dieser Reihenfolge angeordnet sind. Fragmente, die schwach mit pSVc-myc 1 (2.+3. Exon) hybridisierten, gaben mit U157/11 (3. Exon) kein Signal.

5. Durch die Schritte 1.-4. konnte die Zuordnung der Fragmente B/B3 und B/B2 für Typ I, und B/B1 und B/B2 für Typ II erfolgen. Bei beiden Typen resultierte daraus ein 3' Randfragment von 2,3 kb, das aufgrund seiner Größe eindeutig als B/B4 zu identifizieren war. Dies entsprach dem Ergebnis von 4.2.1., ein identisches Randfragment von Typ I und II.

6. Die Fragmente B/B5 Typ I+II (1,2 kb), B/B7 Typ I (1,4 kb) und B/B6 Typ II (0,8 kb) waren durch die Schritte 1.-4. nicht zuzuordnen, da sie sich in ihrer Größe nicht wesentlich voneinander unterschieden. Aufgrund der Identifizierung des typenspezifischen 5' Randbereichs des E/E-Gesamtabschnittes (Gruppe 3, Tab.10, 12), wurde gefolgert, daß B/B7 und B/B6, die beide zur Gruppe 3 gehörten, dort lokalisiert waren. Damit erfolgte die Zuordnung von B/B5 Typ I+II bei beiden Typen in den zentralen Bereich des E/E-Gesamtabschnittes.

Die Anordnung der B/B- und der V/V-Fragmente bestätigte sich durch die 8 zusätzlich ausgeführten Restriktionsenzymanalysen und die Hybridisierungen mit den Subklonen (Abb.16).

4.2.3. Kartierung der enzymspezifischen Schnittstellen von 10 Restriktionsenzymen

Die Feinkartierung der Restriktionsenzymchnittstellen auf dem E/E-Gesamtabschnitt wurde durch die Subklonierung möglich. Damit konnte zum großen Teil die Anordnung kurzer Fragmente identifiziert werden. Die genaue Lokalisation einer Enzymschnittstelle 5' oder 3' von einer BamHI-Schnittstelle, wurde durch die Bestimmung der beiden Randfragmente der entsprechenden Subklone möglich (s.Abb.14II).

Abb.16 zeigt, entsprechend Typ I und II, die Karten der Restriktionsenzyme und die jeweiligen positiven Bereiche für verschiedene Hybridisierungsproben (Tab.4, 11). Als Proben wurden die isolierten E/E-Gesamtabschnitte Typ I und II, die 3 c-myc homologen Proben, sowie Subklone (Insert+Vektor) des Typs I und II verwendet.

4.2.4. Identifizierung der c-myc homologen Sequenzen auf dem klonierten E/E-Bereich Typ I und II des Tumors TV389/1

Abb.16 zeigt für Typ I und II die Restriktionsenzymkarten über den gesamten E/E-Bereich. In Abb.17 sind die Fragmente, die mit den c-myc homologen Proben (Tab.4), dem 1. Exon (S421/1), dem 2. Exon bis 3' Nachbarsequenzen (pSVc-myc 1) und dem 3. Exon (U167/11) hybridisierten, dargestellt.

Nach der Feinkartierung der beiden E/E-Gesamtabschnitte Typ I und II, wurden die Restriktionskarten im Bereich des Genortes mit den Sequenzdaten verglichen (Balb/c Maus, STANTON et al 1984, BERNARD et al 1983, VAX PIR-Programm, EMBL-Datenbank Release 12, Abb.12I). Im nicht rearrangierten Teil des myc Genortes wurde die Lokalisation der Schnittstellen, wenn nötig, korrigiert (Abb.12IV).

Ein Vergleich von Abb.17I+II zeigt, daß die EcoRI-Fragmente Typ I und II in ihrem myc Bereich identisch und rearrangiert sind (rc-myc Gen).

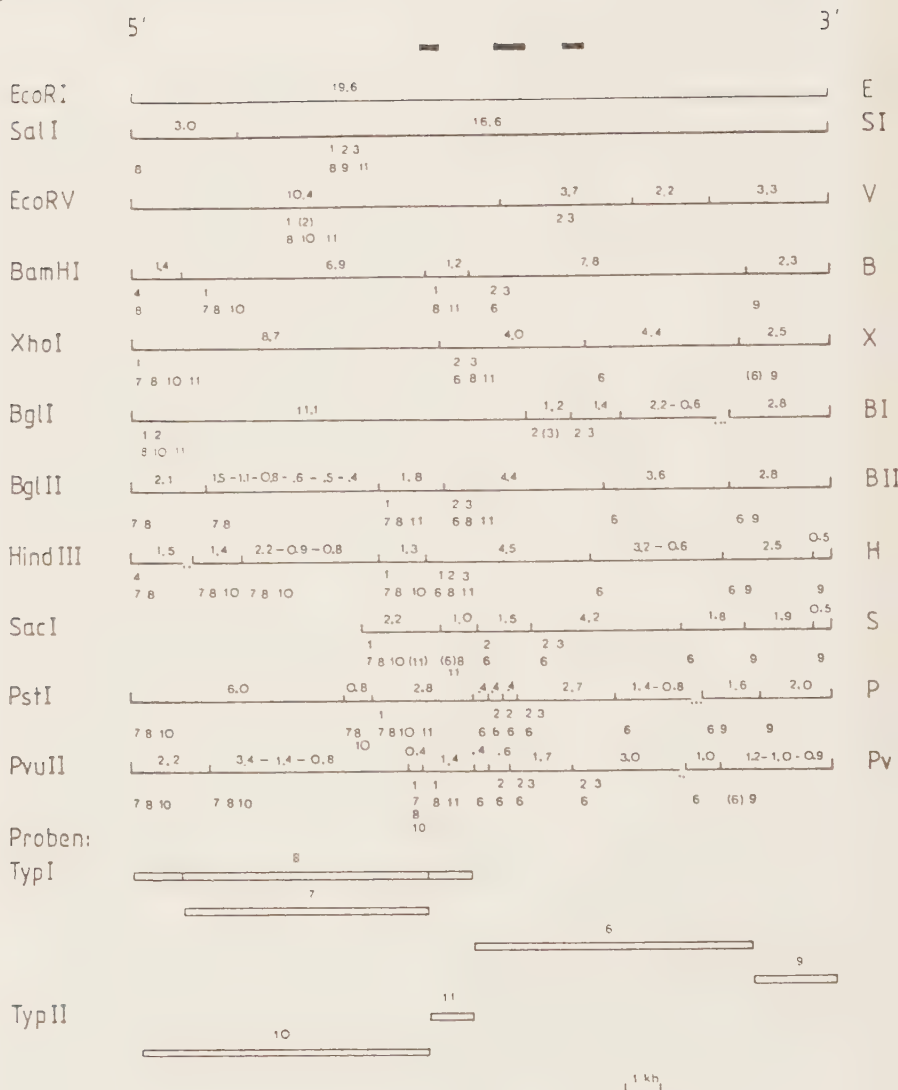
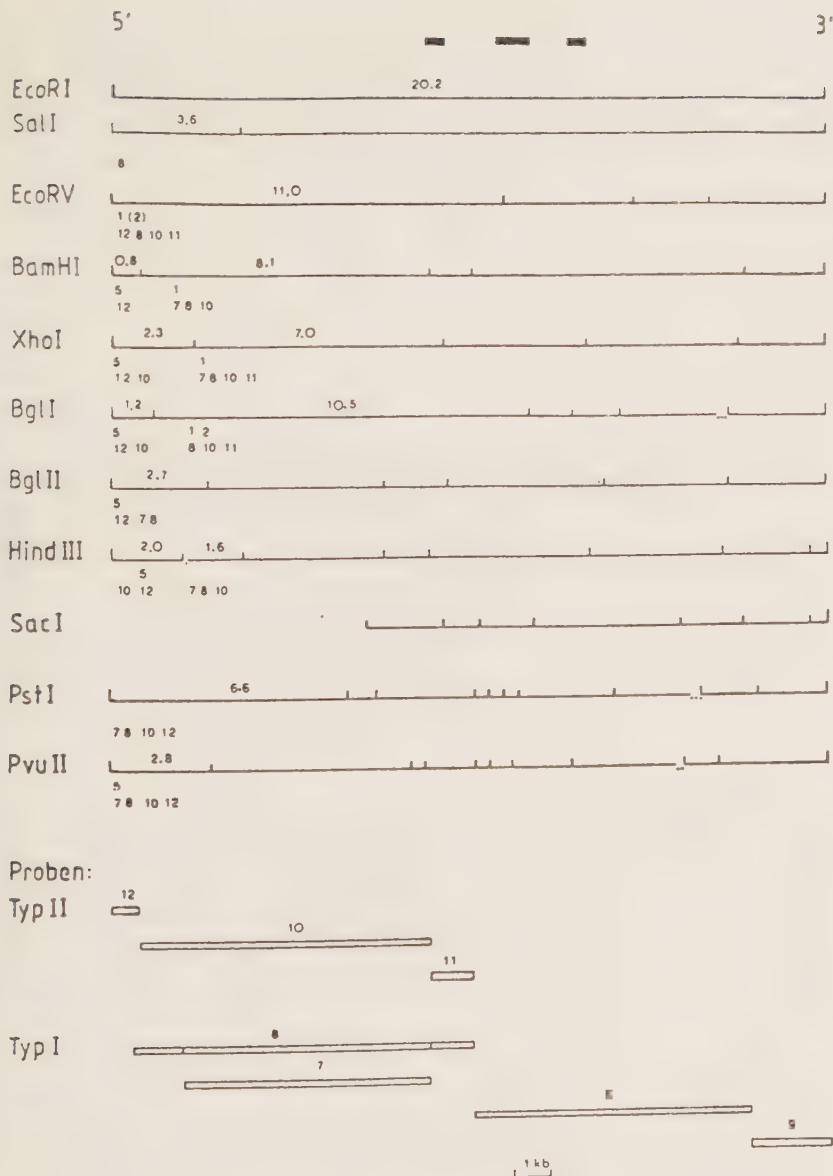


Abb.16: Restriktionskarte des klonierten E/E-Fragments Typ I und des E/E-Fragments Typ II des Tumors TV389/1.

Für Typ I (I.) und Typ II (II.) werden die einzelnen Enzym-Karten gezeigt. Enzymspezifische Fragmente, deren exakte Position nicht bestimmt werden konnte, wurden dem identifizierten Bereich zugeordnet. Für jedes Fragment wurden die Länge (kb-Wert über der Karte) und die Hybridisierungsmerkmale (Nummer 1-12 unter der Karte) eingetragen.



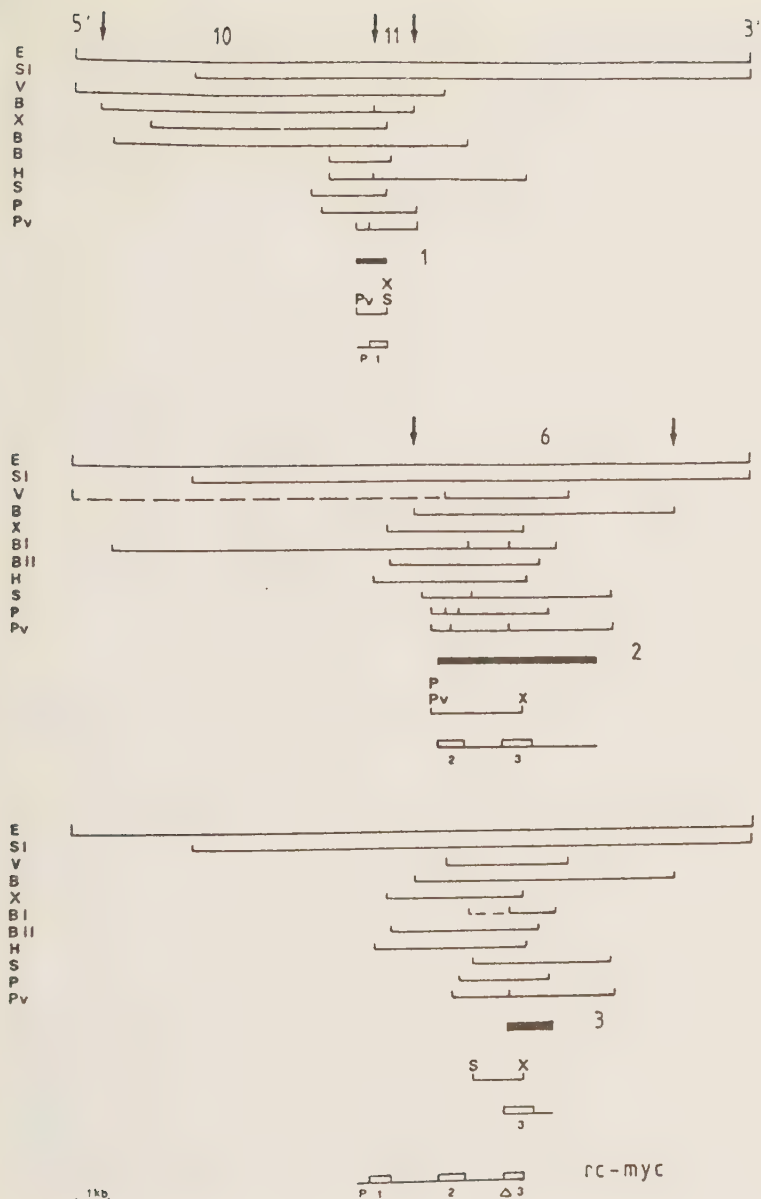
Folgende DNA-Proben wurden eingezeichnet (offener Balken): Subklon-Proben: (6) I13, (7) I21, (8) I17, (9) I51, (10) I123, (11) I169, (12) I166. Typ-spezifische Proben: (4) Klon 11(I), identisch mit E/E-Fragment Typ I; (5) Klon 10(II), identisch mit E/E-Fragment Typ II. Die c-myc-spezifischen Proben (s. Abb. 17): (1) S421/1, (2) pSVc-myc 1, (3) U157/11.

(Zahl) schwaches Hybridisierungssignal; . entspricht Lücke von 100 bp.



Abb.17: Identifizierung des Rearrangements im 3. Exon des *rc-myc* Gens im Tumor TV389/1.

Für den E/E-Gesamtabschnitt Typ I (I.) und Typ II (II.) wurden getrennt nach den Hybridisierungen mit den drei *c-myc* Proben (schwarzer Balken), die Fragmente der 10 Restriktionsenzymanalysen (s.Abb.16) aufgetragen. Proben: (1) S421/1, (2) pSVc-myc 1, (3) U157/11. Für die einzelne Probe



ist der kleinste Bereich des E/E-Abschnittes eingezeichnet, der noch ein Hybridisierungssignal gab. Darunter wurde für jede Probe der homologe Bereich des c-myc Gens aufgetragen (P Promoterbereich). Die Pfeile geben den subklonierten Bereich an (6, 7, 10, 11, Abb.16). Das rc-myc Gen mit dem Rearrangement des 3. Exons, 3' der XhoI-Schnittstelle ist eingezeichnet.

Mit der Probe S421/1 konnte nachgewiesen werden, daß der Promoterbereich und das 1. Exon vorhanden und nicht rearrangiert sind. Die Restriktionsenzymchnittstellen des 1. Introns sind ebenfalls identisch mit denen der normalen c-myc Karte (BERNARD et al 1983). Die Probe pSVc-myc 1 zeigte, daß das 2. Exon und das 2. Intron ebenso vollständig und unverändert vorhanden sind.

Durch die Hybridisierungen mit den Proben pSVc-myc 1 und U157/11 konnte gezeigt werden, daß das 3. Exon des c-myc Gens des Typs I und II bis zu der XhoI-Schnittstelle normal ist. Das Stopcodon der Translation, 13 bp 5' der XhoI-Schnittstelle, ist möglicherweise vorhanden (STANTON et al 1984, APPLE-Macintosh Sequenzierungsprogramm GLYNIAS). Die Bruchstelle des Rearrangements ist im Abschnitt zwischen dieser XhoI- und der HindIII-Schnittstelle lokalisiert (130 bp, BERNARD et al 1983, EMBL-Datenbank). Der anschließende normale 3' Bereich fehlt.

Es handelt sich nicht um eine kleinere Deletion, da der gesamte anschließende 3' Nachbarbereich (XhoI - EcoRI = 6,9 kb) weder mit den Proben pSVc-myc 1 und U157/11 hybridisierte, noch in den Restriktionsenzymchnittstellen mit der Karte von CORCORAN et al (1984) übereinstimmt (4.2.5., Abb.18). Damit fehlt nach STANTON et al (1984) und BERNARD et al (1983) das Poly-A-Signal des c-myc Gens (180 bp 3' dieser HindIII-Schnittstelle, EMBL-Datenbank).

Durch die Identifizierung des myc homologen Bereichs, wurde die Orientierung des E/E-Gesamtabschnittes Typ I und II festgelegt. 5' liegt der Nachbarbereich links von den Promotoren des rc-myc Gens, 3' die Sequenzen rechts vom 3. Exon. Alle gezeigten Karten der E/E-Fragmente Typ I und II weisen bereits die richtige Orientierung auf (Abb.14-17).

4.2.5. Vergleich der E/E-Fragmente Typ I und II mit der normalen Keimbahn-DNA

Nach der Identifizierung des Rearrangements im 3. Exon des klonierten rc-myc Gens, wurden die beiden E/E-Gesamtabschnitte Typ I und II verglichen.

Abb.18 zeigt, daß beide Klone in einem Bereich von 17,5 kb identisch sind (BglII-EcoRI, s.auch Abb.16). Die nicht homologen, typenspezifischen Sequenzen befinden sich jeweils am 5' Rand des E/E-Abschnittes (EcoRI-BglII: Typ I 2,2 kb und Typ II 2,7 kb, s.auch Tab.12).

Zusätzlich wird in Abb.18 die Restriktionskarte des c-myc spezifischen E/E-Fragments von CORCORAN et al (1984, AKR Maus) gezeigelt.

Der 3' Nachbarbereich des rc-myc Gens beider E/E-Fragmente Typ I und II, ist nicht identisch im Restriktionsenzymmuster und im Hybridisierungsverhalten mit dem des normalen c-myc Gens. Ab der Bruchstelle der nichthomologen Rekombination, zwischen der XhoI- und der HindIII-Schnittstelle im 3. Exon, ist damit ein 3' Bereich von 6,9 kb rearrangiert (XhoI - EcoRI).

Der Bereich 5' des rc-myc Gens ist innerhalb von ca. 2 kb mit der normalen Karte identisch (BERNARD et al 1983; EMBL-Datenbank, s.auch Abb.12, 16). Der größere 5' Nachbarbereich von BglII-PvuII=5,6 kb beider Typen I und II, ist wahrscheinlich im Restriktionsenzymmuster mit der Keimbahn-DNA identisch. Für diesen Gesamtbereich liegen zum Teil widersprüchliche und zu wenig Daten aus der Literatur vor. Außerdem sind kleine Unterschiede zwischen den Mäusestämmen möglich. Die Sali-Schnittstelle war in der Literatur nicht beschrieben. Die NMRI Kontroll-DNA zeigte im Verdau Sali+EcoRI mit der Probe S421/1 ein großes Fragment, bei dem nicht geklärt werden konnte, ob es ca. 17 kb oder 20 kb groß war. Das Enzym Sali kann außerdem nur eine nichtmethylierte Erkennungssequenz schneiden (RAZIN+RIGGS 1980).

Der typenspezifische 5' Randbereich des E/E-Fragments Typ I von 2,2 kb ist möglicherweise, aufgrund der BamHI- und HindIII-Schnittstelle, identisch mit der Keimbahn.

Der 5' Randbereich des E/E-Fragments Typ II von 2,7 kb, der nicht identisch ist mit dem des E/E-Fragments Typ I, stimmt nicht im Restriktionsenzymmuster mit der Keimbahn-DNA überein.

Damit beruht der einzige Unterschied zwischen dem E/E-Fragment Typ I und Typ II in der Sequenz im 5' Randbereich.

4.3. Klonierte Sequenzen im Genom der Osteosarkome TV und OTS, und in der Keimbahn-DNA

Die beiden klonierten, myc-spezifischen E/E-Fragmente Typ I und II des Tumors TV389/1, weisen das gleiche rc-myc Gen auf. Der

5' Nachbarbereich des rc-myc Gens ist wahrscheinlich innerhalb von 5,6 kb homolog zur Keimbahn-DNA. Der 3' Nachbarbereich ist rearrangiert. Der Unterschied zwischen den beiden EcoRI-Fragmenten Typ I und II beruht in der 5' Randsequenz (2,2 kb bzw. 2,7 kb).

Das Osteosarkom der Transplantatlinie TV und die Primärtransplantate OTS, sowie die Keimbahn-DNA, wurden nun daraufhin untersucht, zu welchem Anteil die klonierten Sequenzen des Typs I und II im Genom vertreten waren.

Die spezifischen Sequenzen des 1., 2. und 3. Exons der (r)c-myc Gene im Tumor der Linie TV wurden einer detaillierten Analyse unterzogen. Zusätzlich wurde der 5' und 3' Nachbarbereich der (r)c-myc Gene im Tumor TV analysiert.

Die Restriktionsenzymanalysen der hochmolekularen DNAs der Tumoren und der Keimbahn, wurden mit nicktranslatierten, klonierten Sequenzen des E/E-Fragments Typ I und II und mit myc-spezifischen Proben hybridisiert (Tab.4, 11).

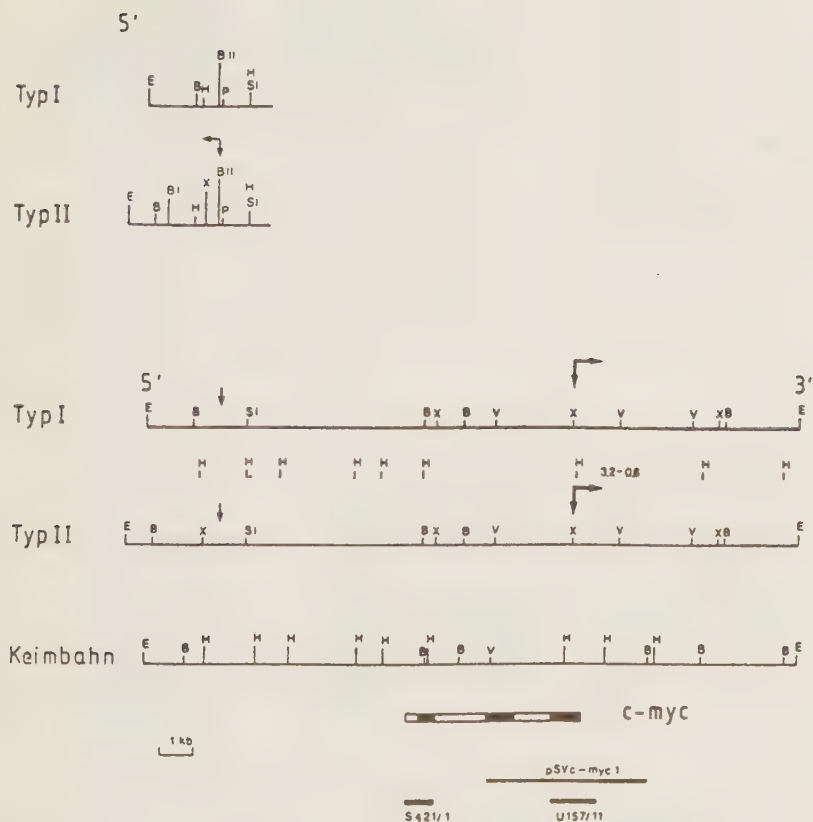


Abb.18: Restriktionskarten des klonierten E/E-Gesamtabschnittes Typ I und Typ II und der Keimbahn-DNA (CORCORAN et al 1984, AKR-Maus). Für den Typ I und den Typ II sind das gesamte EcoRI-Fragment, sowie der typenspezifische 5' Randbereich dargestellt. Die Schnittstellen der Enzyme, für die eine vollständige Kartierung möglich war, sind eingezeichnet. Für das E/E-Fragment Typ I wurden zusätzlich die identifizierten HindIII-Schnittstellen eingetragen.

Die Positionen der Restriktionsenzymschnittstellen der Karte von CORCORAN et al (1984) waren auf einen Gesamtabschnitt von 19,6 kb (E/E I) umgerechnet worden.

Die großen Pfeile kennzeichnen die XhoI-Bruchstelle (X) im 3. Exon und den fremden 3' Nachbarbereich des rc-myc Gens. Die kleinen Pfeile zeigen den typenspezifischen 5' Randbereich, 5' der BglII- Schnittstelle (BII). (Abkürzungen der Enzyme s.Abb.12).

4.3.1. Typ I und Typ II im Genom der Tumoren und in der Keimbahn-DNA

Im Osteosarkom der Linie TV lagen alle myc-spezifischen Sequenzen auf 20 kb EcoRI-Fragmenten (Abb.3A, 4I, Probe pSVc-myc 1; 2.+ 3. Exon - Abb.4III, Probe S421/1; 1. Exon).

In allen Tumoren der Linie TV waren stark amplifizierte DNA-Abschnitte vorhanden, die nicht zu myc Sequenzen homolog waren (Abb.19I-III). Diese amplifizierten Fragmente waren damit zum 5' bzw. 3' Nachbargereich des klonierten rc-myc Gens homolog.

Abb.19I zeigt die Hybridisierung der Tumor-Individuen TV mit dem E/E-Gesamtabschnitt Typ I (Klon 11(I)). Diese Probe ergab im EcoRI-Verdau, außer dem myc-spezifischen von 20 kb, 3 zusätzliche amplifizierte Fragmente von 13,9 kb, 10,4 kb, und 0,9 kb.

Abb.19II zeigt die Tumorgenerationen von 1974-1985, hybridisiert mit dem E/E-Gesamtabschnitt Typ II (Klon 10(II)). Die Probe hybridisierte außer mit 20 kb, mit drei weiteren Fragmenten von 13,9 kb, 10,4 kb und 5,3 kb. Die Bande bei 0,9 kb erschien auch nicht bei der Expositionszeit von 12 Tagen.

Im Genom des Osteosarkoms der Linie TV war damit das EcoRI-Fragment von 0,9 kb Typ I-spezifisch, das Fragment von 5,3 kb Typ II-spezifisch.

Abb.19: Amplifikation der Sequenzen des rc-myc Nachbargereichs in den Tumoren der Linie TV (NMRI) und in Primärtransplantaten OTS aus Osteosarkomen der Balb/c-Maus.

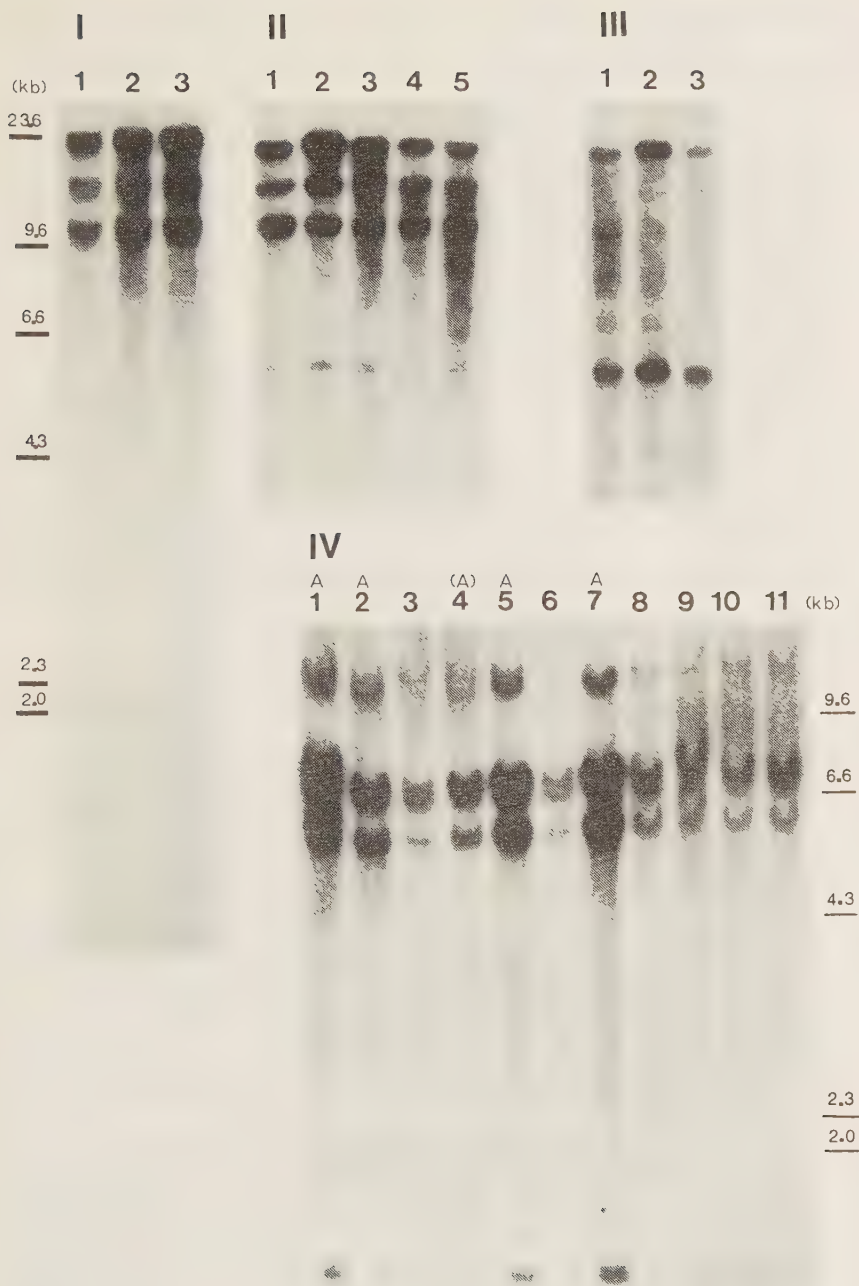
Die DNA der Tumoren TV (I-III) wurde mit EcoRI verdaut, die DNA der Tumoren OTS (IV) mit BamHI. Nach Elektrophorese und Blotten erfolgten die Hybridisierungen der Tumoren TV I. mit der Probe Klon 11(I), Expositionszeit 3 h; Fragment von 0,9 kb nach der Exposition von 1 Tag deutlicher. II. mit der Probe Klon 10(II), Expositionszeit 20 h und III. mit der Probe Subklon II66, Expositionszeit 3 Tage.

IV. Die Hybridisierung der Primärtransplantate OTS erfolgte mit der Probe Klon 11(I). A=Amplifikation des c-myc Gens mit der Probe pSVc-myc 1 und S421/1. (A) schwächere Amplifikation.

I. (1) TV388/3 (1985), (2) TV388/4, (3) TV388/5.

II. und III.: (1) TV385 (1985), (2) TV144 (1976), (3) TV159 (1976); III.: (4) TV40 (1974), (5) TV209 (1978).

IV. (1) OTS69, (2) OTS70, (3) OTS71, (4) OTS72, (5) OTS73, (6) OTS74, (7) OTS75, (8) OTS79, (9) OTS83, (10) Balb/c Leber, (11) OTS87. Längenstandard LSII(kb).



40 Primärtransplantate von Osteosarkomen der NMRI- und der Balb/c-Maus, zeigten mit den Proben Klon 11(I) und Klon 10(II) das gleiche Restriktionsenzymfragmentmuster wie die Kontroll-DNA. Nur die Primärtransplantate mit amplifizierten c-myc Sequenzen, wiesen auch bei diesen beiden Hybridisierungen eine Amplifikation der myc-spezifischen Fragmente auf (Abb.19IV, 6,9 kb, 5,6 kb und 1,2 kb). Zusätzlich waren in diesen Tumoren Fragmente amplifiziert, die homolog zum 5' bzw.

3' Nachbarbereich des klonierten rc-myc Gens waren (6,5 kb und 11,6 kb).

In der Keimbahn-DNA verschiedener Individuen ergaben die Hybridisierungen mit dem E/E-Fragment Typ I und II diskrete, nicht amplifizierte Banden. Diese stellten drei verschiedene Arten von Fragmenten dar. Die ersten waren homolog zu rc-myc Sequenzen, die zweiten zu Sequenzen aus dem normalen 5' Nachbarbereich des rc-myc Gens. Die dritten hybridisierten mit Sequenzen homolog zur fremden

5' Randsequenz des Typs II und zum fremden 3' Nachbarbereich.

Abb.20II zeigt die Analyse der Keimbahn-DNA mit XhoI+EcoRI, hybridisiert mit der Probe Klon 11(I), die zu 4 Fragmenten von 12,2 kb, 10,5 kb, 8,7 kb und 4,0 kb führte. Die Hybridisierung des Doppelverdaus mit dem Klon 10(II) ergab keinen Unterschied zu dem mit Klon 11(I). Die Fragmente von 12,2 kb und 4,0 kb waren pSVc-myc 1-positiv.

Die Tumoren TV und die Keimbahn-DNA wurden mit der Typ II-spezifischen Probe des 5' Randbereichs hybridisiert (Subklon II66 entspricht B/B-Fragment 6, Tab.11).

Bei der Analyse XhoI+EcoRI war der Großteil der Fragmente zwischen 20 kb und 1,0 kb. eine einzelne stärkere Bande war nicht sichtbar (Abb.20I).

In der Keimbahn führte die Hybridisierung der Analyse BamHI+EcoRI, in allen Individuen, über den Fragmentgrößenbereich von 10-0,3 kb zu diskreten Banden (Abb.20I). Die starke Bande von 0,3 kb zeigte, daß Sequenzen dieser Länge in mehr als einer Kopie/haploidem Genom vorlagen,

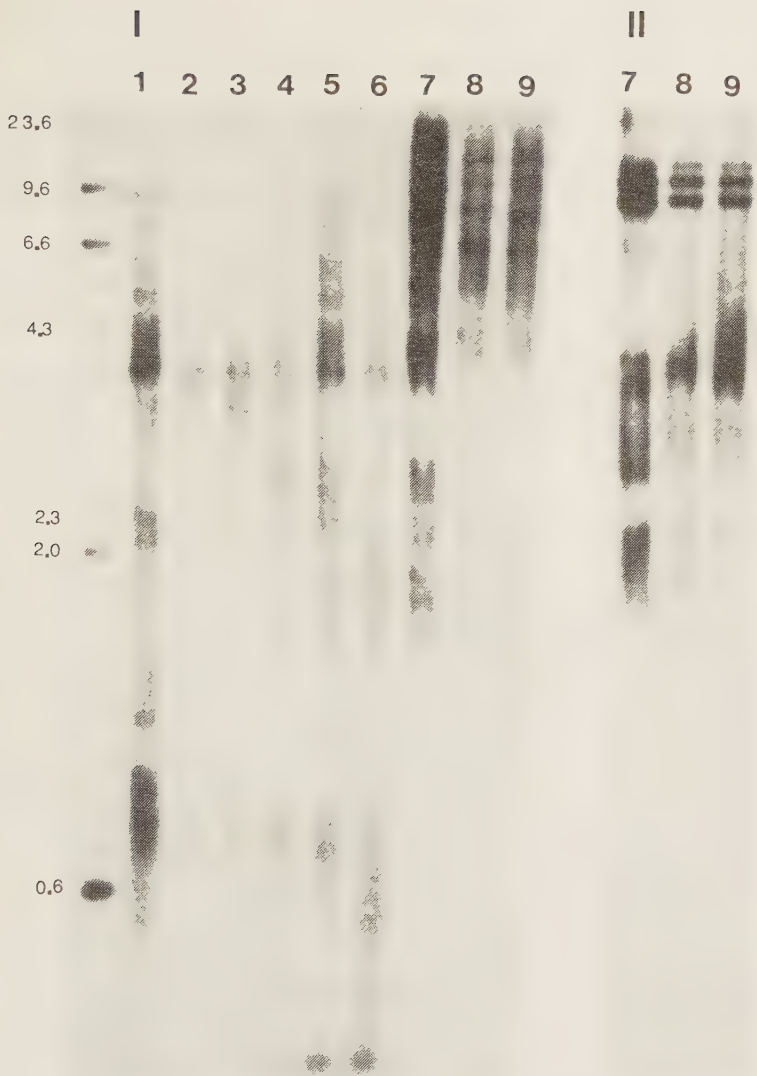


Abb.20: Restriktionsenzymanalyse der klonierten Sequenzen in der Keimbahn-DNA.

Die DNA der NMRI und Balb/c Mäuse wurde mit den Enzymen BamHI+EcoRI (Spur 1-6) und XhoI+EcoRI (7-9) verdaut. Nach Gelelektrophorese und Blotten, wurde hybridisiert: I. mit der Probe Subklon II66, Expositionszeit 20 h. II. mit der Probe Klon 11(I), Expositionszeit 5 Tage.

NMRI Leber und Gehirn (1)-(5), (7)-(9); Balb/c Embryo (6). Längenstandard LSH (kb).

damit hoch-repetitiv waren.

Damit stellt der typenspezifische 5' Randbereich des E/E-Fragments Typ II aus dem Tumor TV389/1 eine hoch-repetitive Sequenz dar.

In den TV-Tumoren führte die Hybridisierung mit der Typ II-spezifischen Probe II66 zu den stark amplifizierten EcoRI-Fragmenten von 20 kb (myc-spezifisch) und 5,3 kb (Abb.19III).

Im Genom der TV-Tumoren lagen damit stark amplifizierte Fragmente vor, die nicht zu c-myc Sequenzen homolog waren, jedoch zu den (rearrangierten) Nachbargenen. Diese Fragmente waren unabhängig von rc-myc Sequenzen amplifiziert worden.

4.3.2. (r)c-myc Gene im Genom der Tumoren TV

Die Exons der (r)c-myc Gene im Genom des Tumors TV385 wurden einer detaillierten Analyse unterzogen.

Das normale c-myc Protooncogen besitzt 3 Exons, wobei das 2. und das 3. translatiert wird (STANTON et al 1983, 1984, BERNARD et al 1983). Am 5' Ende sind die beiden Promotoren lokalisiert (BERNARD et al 1983, STANTON et al 1983). Nach den Sequenzierungsdaten beträgt die Größe für das murine 1. Exon 565 bp, für das 2. Exon 773 bp und für das 3. Exon 897 bp (BERNARD et al 1983, EMBL-Datenbank).

Mit spezifischen Endonukleasen wurden die 3 Exons der (r)c-myc Gene aus der hochmolekularen DNA des TV385 ausgeschnitten (Abb.21).

5' Nachbarsequenzen, Promoterbereich und 1. Exon der myc Gene wurden mit den Restriktionsenzymanalysen SacI, SacI+PvuII, PvuII und PvuII+XhoI und der Hybridisierung mit S421/1 erhalten (1. Exon human Tab.4, Abb.21I). In keiner der Analysen war ein Rearrangement der Tumor-DNA im Vergleich zur NMRI-Maus zu beobachten (Abb.21IIa,b). Im Tumor waren die normalen Fragmente des 5' Nachbar- und Promoter-Bereichs, sowie das 1. Exon stark amplifiziert (Abb.8IV, Tab.8).

Die erste Hälfte des 1. Introns war ebenfalls im Tumor nicht

rearrangiert, aber amplifiziert (PvuII/PvuII-Fragment mit S421/1, 1,3 kb, Abb.21Ib).

Die Analyse des 2. Exons erfolgte mit den Enzymen PstI, SacI und PvuII und der Hybridisierung mit der Probe pSVc-myc 1 (2.+3. Exon murin Tab.4, Abb.21I). Damit konnte auch die zweite Hälfte des 1. Introns erfaßt werden. Bei den Analysen waren im Tumor die normalen Fragmente dieses Bereichs des c-myc Gens vorhanden und stark amplifiziert (Abb.21III,IVb, 8I, Tab.8).

In diesen drei Analysen wurden zusätzlich zu den normalen Fragmenten, rearrangierte, amplifizierte Banden sichtbar (Abb.21III,IV). Die Probe pSVc-myc 1 hybridisiert - außer mit dem 2. Exon - mit dem 2. Intron, dem 3. Exon und 3' benachbarten Sequenzen. In einer weiteren Analyse des 3. Exons, wurde dieses mit PvuII+XhoI ausgeschnitten und mit der Probe U157/11 hybridisiert (3. Exon human Tab.4, Abb.21I). Wie bei den Analysen für den Promoterbereich mit einschließlich 2. Exon des Gens, waren im Tumor das normale Fragment des 2. Introns (1,8 kb) und der Bereich PvuII-XhoI des 3. Exons bis zur XhoI-Schnittstelle (0,4 kb) vorhanden und amplifiziert (Abb.21IVa, 8V, Tab.8).

Das PvuII-Fragment von 3,6 kb war im Tumor und in der Kontroll-DNA durch den Doppelverdau PvuII+XhoI nur partiell in das XhoI/PvuII-Fragment von 3,2 kb überführt worden (Abb.21IVa,b). Das normale 3,2 kb Fragment, das ca. 200 bp des 3. Exons und 3' Sequenzen enthält, hybridisierte ausschließlich mit der murinen Probe pSVc-myc 1, nicht mit der humanen, weniger homologen Probe U157/11.

Auch in dieser Analyse waren rearrangierte Fragmente sichtbar (Abb.21IV). Im Tumor TV lag jedoch bei allen (r)c-myc Genen kein Rearrangement des 2. Exons und des 2. Introns vor. Dies zeigte, zusätzlich zu den oben genannten Analysen, die PvuII-Analyse beim Vergleich der Hybridisierungen mit pSVc-myc 1 und U157/11. Von den normalen PvuII-Fragmenten leuchtete bei der NMRI- und der Tumor-DNA nur

das von 0,6 kb des 2. Exons, mit der längeren Probe pSVc-myc 1 zusätzlich auf (Abb.21IVa,b).

Damit lagen im Tumor TV nur rc-myc Gene mit Rearrangement(s) im 3. Exon vor.

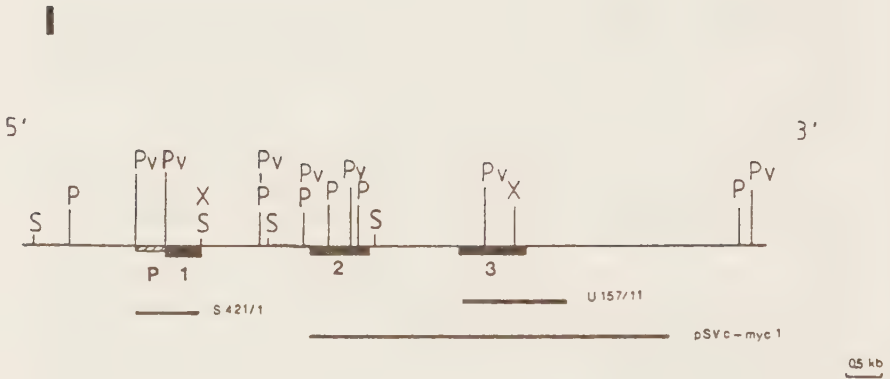


Abb.21: Restriktionsenzymanalysen des Promoterbereichs und der 3 Exons des c-myc Gens im Tumor TV385.

I. Restriktionskarte des c-myc Gens und die Proben S421/1, pSVc-myc 1 und U157/11. P Promoterbereich, Abkürzung der Enzyme s.Abb.12.

II. Die Fragmente des 1. Exons und des Promoterbereichs wurden aus der DNA des Tumors und der NMRI-Kontrolle geschnitten, mit den Enzymen a. SacI (Spur 1-2), SacI+PvuII (3-4) und b. mit PvuII (1-2), PvuII+XhoI (3-4). Nach Auftrennung und Blotten, wurde die Hybridisierung mit der Probe S421/1 durchgeführt. Expositionszeit 17 Tage; Fragmente von 0,4 kb und 0,6 kb der NMRI Kontrolle nach Überexpositionszeit deutlicher.

III. Die Fragmente, spezifisch für das 2. Exon wurden ausgeschnitten mit den Enzymen a. SacI (1-2), b. PstI (1-2). Die Hybridisierung erfolgte mit der Probe pSVc-myc 1. Expositionszeiten 5 Tage (III.a.) und 13 Tage (III.b.).

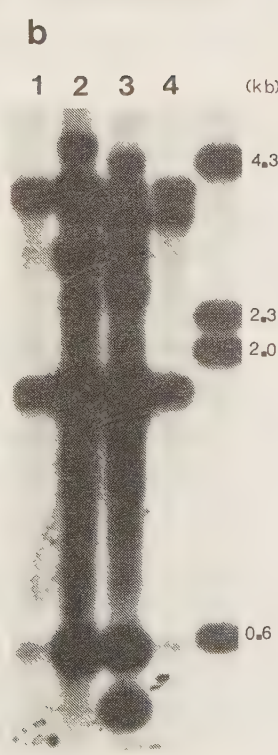
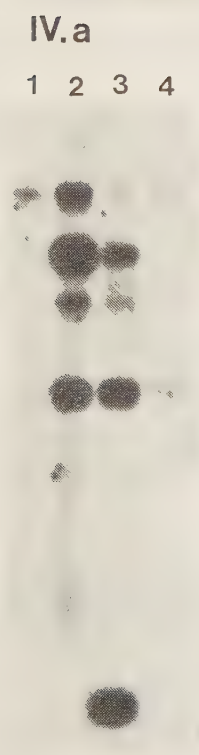
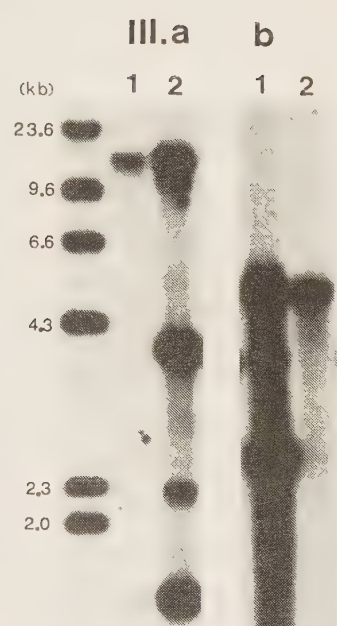
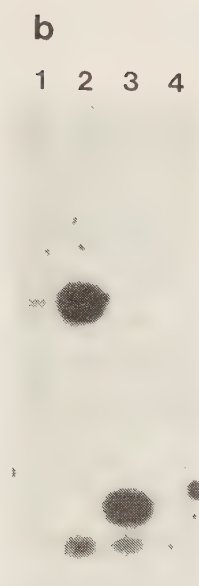
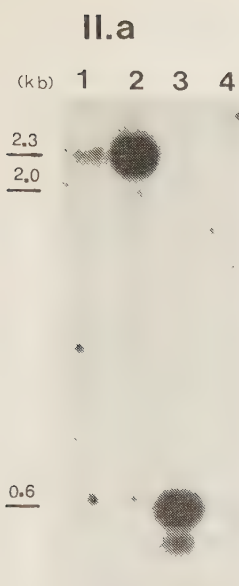
IV. Die Analyse des 3. Exons erfolgte mit den Enzymen PvuII (1-2) und PvuII+XhoI (3-4). Die Hybridisierungen erfolgten a. mit der Probe U157/11, Expositionszeit 20 Tage; und b. mit der Probe pSVc-myc 1. Expositionszeit 13 Tage.

II. (1) NMRI Leber, (2)-(3) TV385, (4) NMRI Leber. Längenstandard LSII (kb).

III.a. (1) NMRI Leber, (2) TV385. Längenstandard LSII (kb).

III.b. (1) TV385, (2) NMRI Leber.

IV. (1) NMRI Leber, (2)-(3) TV385, (4) NMRI Leber, Längenstandard LSII (kb).



4.3.3. 5' und 3' Nachbarbereich der (r)c-myc Gene im Tumor TV

Die Analysen des Tumors TV mit Enzymen, die im 5' und 3' Nachbarbereich der (r)c-myc Gene schnitten, führten zu normal großen und zu rearrangierten Fragmenten. In Abb.22I sind für die Analyse BglI/BglI+EcoRI (BI/BI+E) die Fragmente des Tumors TV dargestellt, die mit verschiedenen Proben hybridisierten (Tab.4, 11).

Möglicherweise ist im Tumor TV ein 5' Nachbarbereich von ungefähr 6 kb bei allen (r)c-myc Genen nicht rearrangiert. Bei der BglI-Analyse des 5' Nachbarbereichs des 1. Exons im Genom des Tumors TV, hybridisierten 2 Fragmente von 18,1 kb und 10,5 kb mit der Probe S421/1 (1. Exon). Möglicherweise handelte es sich bei 18,1 kb um das normale Fragment, da es im Doppelverdau BglI+EcoRI im Tumor nicht mehr vorhanden war. Das Fragment von 10,5 kb war möglicherweise aufgrund seiner Größe Typ II-spezifisch (Abb.22II), es wurde auch durch den Doppelverdau nicht betroffen.

Bei der Analyse mit SacI, das 1,8 kb 5' des c-myc Gens schneidet, hybridisierte die Probe S421/1 im Tumor ausschließlich mit einem normalen Fragment von 2,3 kb.

Die DNA-Probe I21, die zu einem größeren 5' Bereich des c-myc Gens homolog ist, hybridisierte im Tumor mit denselben amplifizierten, normalen Fragmenten wie die Probe S421/1 (Abb.22I). Zusätzlich gab das Fragment von 2,2 kb ein schwächeres Signal und beinhaltete damit amplifizierte Sequenzen aus dem normalen 5' Nachbarbereich des c-myc Gens. Diese Kopie lag unabhängig vom E/E-Gesamtabschnitt vervielfältigt vor.

Die Restriktionsenzymanalysen vom 3' Nachbarbereich der (r)c-myc Gene im Tumor TV, führten mit den Proben pSVc-myc 1 und U157/11 zu normalen und zu einer Vielzahl von rearrangierten Fragmenten (Abb.21III,IV).

Diese Analysen zeigten, daß im Tumor TV das klonierte rc-myc Gen in

(kb)	BI	BI+E	1	2	3	4	5	6
18,1	+	-	+	+	+	+	+	+
10,5	+	+	+	+	+	+	+	+
9,3	+	-	-	-	-	-	(+)	-
6,9	+	-	+	+	-	-	-	(+)
5,9	+	-	+	+	-	-	-	(+)
4,6	+	-	-	-	-	-	+	-
4,1	-	+	+	+	-	-	-	-
2,8	-	+	+	+	-	(+)	-	+
2,2	+	+	+	+	-	-	+	+
1,4	+	+	+	+	-	-	+	+
1,2	+	+	+	+	-	-	+	+
0,6	+	+	+	+	-	-	-	-
0,4	+	+	+	+	-	-	-	-

II

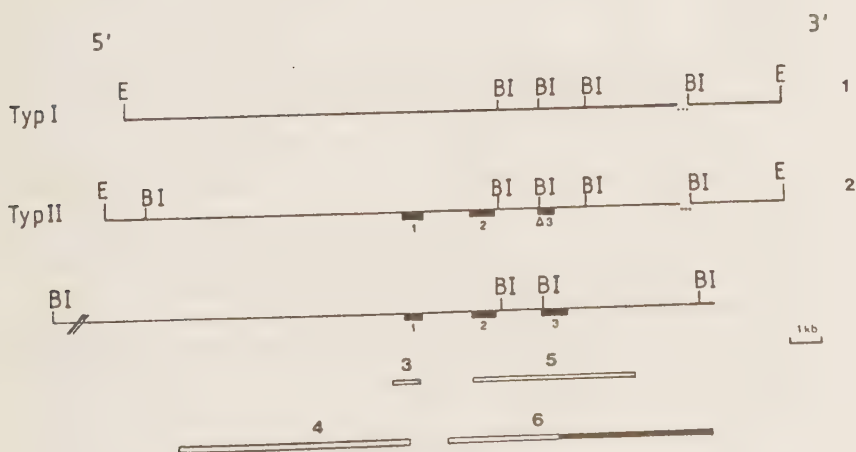


Abb.22: Restriktionsenzymanalyse der (r)c-myc Gene im Tumor der Linie TV.

I. Fragmente (kb) des Einzelverdaus der Tumor-DNA mit BglII, und die Fragmente des Doppelverdaus mit BglII+EcoRI. Die Hybridisierungseigenschaften mit den Proben (1-6) ist gekennzeichnet. (+) schwaches Signal. II. Restriktionskarten für BglII+EcoRI des klonierten E/E-Fragments Typ I und Typ II des Tumors TV389/1, sowie der NMRI Keimbahn-DNA (BglII). Proben: (1) Klon 11(I), (2) Klon 10(II), (3) S421/1, (4) Subklon 121, (5) pSVc-myc 1, (6) Subklon 113. Im Subklon 113 ist der fremde, rearrangierte 3' Teil angegeben.

vielen Kopien vorlag. Bei der detaillierten Analyse des 3. Exons im Tumorgenom, hybridisierten zusätzliche Banden mit pSVc-myc 1 und U157/11. Die jeweils starken, rearrangierten Banden der einzelnen Restriktionsenzymanalysen stimmten in ihrer Größe mit denen des kartierten rc-myc Gens überein (SacI 4,2 kb; SacI+PvuII 2,7 kb; PvuII 3,0 kb; PvuII+XhoI 0,4 kb, PstI 2,7 kb, s.Abb.12IV).

Bei den anderen rearrangierten Fragmenten war nicht immer zu unterscheiden, ob mit den myc-spezifischen Proben pSVc-myc 1 und U157/11, myc-Sequenzen oder normale 3' Sequenzen im Genom des Tumors TV hybridisierten. Es war nicht eindeutig zu klären, ob im Tumor TV noch normale, amplifizierte c-myc Gene vorhanden waren. Möglicherweise lagen im Tumor TV weitere rc-myc Gene vor, mit Rearrangement im 3. Exon (s.4.3.2.).

Auch war nicht auszuschließen, daß im Tumor TV normale c-myc Gene vorhanden waren, die innerhalb von ca. 7 kb im 3' Nachbarbereich rearrangiert waren. Dies würde bei den entsprechenden Restriktionsenzymanalysen und Hybridisierungen mit pSVc-myc 1 und U157/11 ebenfalls zu rearrangierten Banden führen.

Die rearrangierten Fragmente des Tumors TV konnten homolog zum klonierten rc-myc Bereich oder zu der fremden 3' Nachbarsequenz sein (Proben Klon 11(I), Klon 10(II) und Subklon I13).

Bei der Analyse des 2. und 3. Exons im Genom des Tumors TV mit dem Enzym BglII, hybridisierten 2 Fragmente ausschließlich mit der Probe pSVc-myc 1 (2.+3. Exon, 9,3 kb und 4,6 kb, Abb.22I). Sie hybridisierten nicht mit dem E/E-Fragment Typ I und Typ II (Klon 11(I) und Klon 10(II)). Ein BglII-Fragment der Größe 9,3 kb gehört nicht zu den normalen Fragmenten im Bereich des c-myc Gens und wurde auch nicht in den klonierten E/E-Fragmenten Typ I und II des rc-myc Gens beobachtet (Abb.16). Das Fragment von 4,6 kb im Tumor TV entsprach in der Größe dem der Keimbahn. Auf dem normalen Fragment, das durch den Doppelverdau BglII+EcoRI nicht

betroffen wird, liegen 5' ungefähr 0,6 kb des 3. Exons des c-myc Gens.

Die Probe I13, die unter anderem das 3. Exon des rc-myc Gens und die fremde 3' Sequenz enthält, gab kein Signal mit den beiden BglI-Fragmenten von 9,3 kb und 4,6 kb (Abb.22I). Das B/B-Fragment 2 (Probe I13) ist 5' von der XhoI-Bruchstelle nicht rearrangiert und enthält 0,4 kb des 3. Exons. Dieser Bereich reicht für ein Hybridisierungssignal aus, wenn homologe Sequenzen vorhanden sind. Damit konnte das Fragment von 4,6 kb im Tumor kein normales sein, da es außerdem durch den Doppelverdau BglI+EcoRI geschnitten wurde.

Im Tumor TV hybridisierten möglicherweise bei beiden Fragmenten die pSVc-myc 1-homologen Sequenzen, die 3' von der XhoI-Bruchstelle im 3. Exon des rc-myc Gens lagen.

Bei dem BglI-Fragment von 9,3 kb, das mit pSVc-myc 1 ein schwächeres Signal gab, war nicht zu unterscheiden, ob dieses Fragment in weniger Kopien im Tumorgenom vorlag, oder ob es weniger homolog zur DNA-Probe war.

Die Analyse der myc-spezifischen Sequenzen im Genom des Tumors TV bestätigte, daß die Amplifikation bestimmter Bereiche und deren anschließende, lineare Anordnung ein hoch-komplexer Vorgang ist.

5. Diskussion

5.1. Die Oncogene c-sis, c-mos und c-myc in murinen Osteosarkomen

Eine Veränderung in Protooncogenen wurde bei einer Reihe von murinen und humanen malignen Tumoren beschrieben (WILLECKE+SCHÄFER 1984, BISHOP 1985, 1987, BARBACID 1986). Diese Untersuchungen wurden häufig an Geweben aus Burkitt- und T-Zell-Lymphom, Plasmacytom oder Karzinom durchgeführt. Osteosarkome wurden seltener der molekularbiologischen Analyse nach aktivierten Protooncogenen unterzogen.

In humanen und murinen Osteosarkomen wurde die veränderte Expression der Oncogene c-sis, c-mos und c-myc beobachtet (EVA et al 1982, GRAVES et al 1984, SCHWAB et al 1985, SCHÖN et al 1986, YOKOTA et al 1986).

Eine erhöhte Expression des Protooncogens c-sis in humanen Osteosarkomen wurde von EVA et al (1982) und GRAVES et al (1984) beschrieben. Eine Studie in unserem Labor wies nach, daß in den beiden murinen, strahleninduzierten Osteosarkomen TV und OS5 das c-sis Gen stärker als in 12 anderen Tumoren und den Kontrollgeweben exprimiert wird (SCHÖN et al 1986).

In 12 untersuchten murinen Osteosarkomen wurde keine Veränderung im Restriktionsenzymmuster und keine Amplifikation des c-sis Protooncogens festgestellt (Tab.5, Abb.10AIII,BIII; BamHI, SacI). Die erhöhte Expression in den Tumoren OS5 und TV beruht daher nicht auf einem Rearrangement oder einer Amplifikation des Gens.

SCHÖN et al (1986) wiesen in einem von 18 murinen Osteosarkomen eine starke Expression des c-mos Protooncogens nach. In der vorliegenden Arbeit wurde in keinem der 17 untersuchten Osteosarkome eine Strukturänderung oder eine Amplifikation des Gens gefunden (Tab.5, Abb.4II, 6II, 7II; EcoRI, SacI, BamHI).

Möglicherweise wird die erhöhte Expression dieser Protooncogene durch

eine veränderte Stimulation des normalen Gens, durch die cis- oder trans-Aktivität eines spezifischen Proteins bedingt (KINGSTON et al 1985, SHORT 1987, SASSONE-CORSI + BORRELLI 1986).

Kleinere Strukturänderungen, die durch diese Methode nicht erfaßt werden, könnten jedoch auch negative 5' oder 3' Kontrollelemente des Genortes und damit eine (post)transkriptionale Regulation des Gens stören (BRAWERMAN 1987, CLEMENS 1987).

In verschiedenen Osteosarkomen wurde eine Veränderung der Struktur und/oder der Expression des c-myc Gens gefunden (EVA et al 1982, SCHWAB et al 1985, SCHÖN et al 1986, YOKOTA et al 1986). SCHWAB et al (1985) wiesen eine 15 bis 30-fache Amplifikation des c-myc Gens in Zelllinien eines Osteosarkoms nach, die zur 5 bis 25-fach erhöhten Expression führte.

In 3 der 26 untersuchten Osteosarkome ist der c-myc Genort amplifiziert (Tab.6, Abb.3, 5, 6, 7). In den Osteosarkomen TV und OTS35/1 ist das c-myc Gen zusätzlich rearrangiert, im Tumor OTS95/1 normal (Abb.3BI, 5I, 7I).

In den Tumoren der Transplantatlinie TV ist die Amplifikation und das veränderte Restriktionsenzymmuster im Untersuchungszeitraum von 11 Jahren stabil (Abb.3BI). Das EcoRI-Fragment von 20 kb, auf dem alle Kopien des (rearrangierten) c-myc Gens liegen, zeigt im Tumor TV ein ungefähr 30-fach stärkeres Signal als die Kontroll-DNA (Abb.4, Tab.7).

In den NMRI Primärtransplantaten OTS35/1 und OTS95/1 ist das c-myc Gen ebenfalls stark amplifiziert (Abb.5, 7).

In analogen Studien in Primärtransplantaten der Balb/c-Maus waren in 7 von 28 Osteosarkomen (25 %) ein amplifiziertes c-myc Oncogen gefunden worden, das in einem Osteosarkom zusätzlich rearrangiert war (STRAUSS, persönl. Mit.).

Insgesamt war damit in 10 von 54 murinen Osteosarkomen eine

Amplifikation mit teilweiseem Rearrangement des c-myc Protooncogens feststellbar. Die Amplifikation des c-myc Gens stellt damit kein Einzelereignis in murinen Osteosarkomen dar.

Die Amplifikation des c-myc Oncogens hatte in 5 untersuchten Osteosarkomen immer eine erhöhte Expression zur Folge (Abb.11A, Tab.9). Im Tumor TV wird die c-myc mRNA ungefähr 25-fach stärker exprimiert, im Tumor OTS35/1 ca. 6-fach höher als in den Kontrollen. Die untersuchten Tumoren der NMRI und Balb/c Maus, die ein normales c-myc Protooncogen aufwiesen, zeigten keine erhöhte Expression (Tab.9 und STRAUSS, persönl. Mit.).

Bei der Transplantatlinie DOS und der Zelllinie OS5, deren c-myc Protooncogen nicht verändert ist (Tab.6), war von SCHÖN et al (1986) eine erhöhte Expression beobachtet worden. Die normale Expression des c-myc Gens wird unter anderem durch posttranskriptionale Mechanismen kontrolliert (DANI et al 1984, PIECHACZYK et al 1985, BLANCHARD et al 1985). Möglicherweise ist in den beiden Tumoren DOS und OS5, die erhöhte Expression durch eine Deregulation der posttranskriptionalen Kontrolle bedingt.

In den Geweben aus Thymus und Embryo wird das c-myc Protooncogen exprimiert. In der Leber adulter Mäuse ist, wie bei SCHÖN et al (1986), keine Expression zu beobachten. In adulten Ratten wurde jedoch die Expression in der normalen Leber festgestellt (MATOCHA et al 1987, JENKE persönl. Mit.).

In welchem Stadium der Genese des Osteosarkoms die Amplifikation des c-myc Protooncogens eintritt, konnte nicht geklärt werden, da die Tumoren bereits den malignen Phänotyp zeigten. Die Tumorgenese ist ein komplexer Vorgang, der wahrscheinlich nicht nur auf der Veränderung eines einzelnen Gens beruht (WEINSTEIN et al 1984, DUESBERG 1987, SORRENTINO et al 1987).

Die Amplifikation des c-myc Gens spielt für die Initiation des Osteosarkoms wahrscheinlich eine geringe Rolle, da sie auch nicht in allen Tumoren auftritt (s.auch COLE 1986). Möglicherweise trägt die Amplifikation des c-myc Gens zur Progression und Ausprägung des malignen Phänotyps der Tumoren bei. In einem der Tiere, dessen Osteosarkom ein amplifiziertes c-myc Gen aufwies, war eine Metastase zu beobachten. YOKOTA et al (1986) und WONG et al (1986) wiesen in mehreren Tumoren eine Amplifikation des c-myc Gens im Primärtumor und in den Metastasen nach. In diesen Tumoren trat die Amplifikation des c-myc Gens vor der Metastasierung ein. MONNAT et al (1987) zeigten jedoch in einem Fall, daß die c-myc Amplifikation nur in der Metastase zu beobachtet war.

Wahrscheinlich ist die Amplifikation ein Phänomen, das erst in einem späten Stadium der Genese des Osteosarkoms auftritt. Bei verschiedenen Tumoren wird eine Korrelation zwischen der Amplifikation eines Oncogens und dem Stadium der Krankheit beobachtet (SEEGER et al 1986, WONG et al 1986, YOKOTA et al 1986). Der Amplifikationsgrad des N-myc Oncogens in Neuroblastomen (MÄKELÄ+ALITALO 1986, SEEGER et al 1986) und des HER-2/neu-Oncogens in Mammarkarzinomen (SLAMON et al 1987), wird bereits für die Prognose und für die Wahl der entsprechend aggressiven Behandlung des Patienten verwendet (KOLATA 1987).

Die Ursache der Amplifikation des c-myc Gens in den Osteosarkomen, kann nicht eindeutig auf die Strahleninduktion zurückgeführt werden. Von den 23 strahleninduzierten Osteosarkomen zeigten nur drei ein amplifiziertes c-myc Gen. SAWEY et al (1987) wiesen jedoch in 10 von 12 gamma-induzierten Haut-Tumoren ein amplifiziertes, teilweise rearrangiertes myc Gen nach.

Ein weiteres Oncogen, das durch ionisierende Strahlung in vivo und in vitro aktiviert werden kann, ist c-ras^{K1} (GUERRERO et al 1984a,b, SAWEY et al 1987, MIZUKI et al 1985). Tumoren mit aktiviertem c-ras^{K1} zeigten häufig eine Amplifikation des (r)c-myc Gens (SAWEY et al 1987).

α -, β - und gamma-ionisierende Strahlung induziert die Amplifikation von integrierten SV40 Sequenzen, einschließlich zellulären Sequenzen, in Hamsterzellen (LÜCKE-HUHLE + HERRLICH 1984, 1987, LÜCKE-HUHLE et al 1986, EHRFELD et al 1986). Dabei ist ein funktioneller Ursprungsort der Virus-Replikation Voraussetzung. Ionisierende Strahlung führt zu einer vorübergehenden Hemmung der DNA-Synthese (PAINTER+YOUNG 1987). SCHIMKE et al (1986) zeigten, daß eine Störung der DNA-Synthese zu einer anschließenden Überreplikation und damit zur Amplifikation bestimmter DNA-Segmente führen kann.

Eine Amplifikation des c-myc Protooncogens wurde nicht nur in strahleninduzierten, sondern auch in chemisch- und virus-induzierten Tumoren gefunden (YANDER et al 1985, SCHWAB et al 1985).

5.2. Bereich der Amplifikation im Tumor-Genom

Das murine c-myc Protooncogen ist auf dem Chromosom 15 lokalisiert (CREWS et al 1982). In Zellen von murinen und humanen Tumoren werden häufig Chromosomenanomalitäten beobachtet (YUNIS 1981, HERBST+GROPP 1982, MILLER+MILLER 1983, ROWLEY 1983, MITELMAN 1984, HEIM+MITELMAN 1987). Damit ist im Genom einer Tumorzelle meist nicht nur ein einzelner Genort betroffen (WEINSTEIN et al 1984, DUESBERG 1987). KINZLER et al (1986) zeigten, daß bei der Amplifikation des c-myc und des N-myc Oncogens in Neuroblastomen immer ein großer Nachbarbereich koamplifiziert ist (s.auch ROBERTS et al 1983). Eine Koamplifikation mit dem c-erbA Oncogen wurde auch für das neu-Oncogen in Mammakarzinomen beobachtet (VIJVER et al 1987).

In den murinen Osteosarkomen wurde untersucht, welcher Bereich auf dem Chromosom 15 zusätzlich zum c-myc Gen amplifiziert ist. Dazu wurden Proben der Genorte Mlvi-1, Mlvi-2 und c-sis verwendet (Abb.9).

In den NMRI Osteosarkomen TV, OTS35/1 und OTS95/1 ist eine

Koamplifikation des c-myc Genortes und des Mlvi-1 Locus zu beobachten (Abb.4IV, 8III, 7III, 10AII,BII). In keinem der anderen 21 untersuchten Osteosarkome mit normalem c-myc Gen, wurde ein amplifizierter Mlvi-1 Locus festgestellt (Abb.6III, 7III, 10BII).

In keinem der untersuchten Osteosarkome trat eine Amplifikation des Mlvi-2 und des c-sis Locus auf (Abb.4V, 10AI,III,BI,III).

Auch bei der Balb/c-Maus war nur in den 7 Tumoren eine Amplifikation des Mlvi-1 Locus zu beobachten, in denen das c-myc Gen in mehreren Kopien vorlag (STRAUSS, persönl. Mit.). Die Genorte c-sis und Mlvi-2 waren ebenfalls nicht betroffen.

Die Untersuchung der Osteosarkome zeigte, daß im Tumorgenom ein größerer Bereich amplifiziert vorliegt. Der Abstand zwischen den beiden Loci c-myc und Mlvi-1 entspricht ungefähr einer Chromosomenbande und damit einer Länge von mehr als 10^3 kb (ADOLPH et al subm.). Molekularbiologisch konnte nicht geklärt werden, ob der gesamte Bereich zwischen c-myc und Mlvi-1 amplifiziert ist, da spezielle Proben fehlten. Die Hybridisierungen mit den Proben für das c-sis Oncogen und den Mlvi-2 Locus zeigten, daß nur ein begrenzter Bereich auf dem Chromosom 15 amplifiziert ist. Das α -Globin Pseudogen Hba-3ps (LEDER et al 1981), das in der Nähe von Mlvi-1 lokalisiert wurde (ADOLPH et al subm.), war auch in Osteosarkomen mit Koamplifikation der c-myc und Mlvi-1 Loci nicht amplifiziert (STRAUSS, persönl. Mit.). Damit liegt das eine Ende der "Amplifikationseinheit" in diesen Tumoren zwischen Mlvi-1 und dem α -Globin Pseudogen.

Im Tumor TV war das c-myc Gen stärker als Mlvi-1 amplifiziert, in den Tumoren OTS35/1 und OTS95/1 der Mlvi-1 Locus stärker (Abb.7).

Die Ursache dafür könnte eine unabhängige Amplifikation der beiden Genorte im einzelnen Tumor sein. Dies würde zu einer unterschiedlichen Kopienzahl in den Zellen führen.

ROBERTS et al (1983), ALITALO (1984a) und MÄKELÄ+ALITALO (1986) zeigten

die 2. Möglichkeit. Bei der Amplifizierung eines bestimmten DNA-Segments, ausgehend von einem Ursprungsort der Replikation, werden die zentralen Sequenzen stärker als die äußeren Abschnitte amplifiziert (Zwiebelschalenmodell, BOTCHAN et al 1979). Die Unterschiede im Amplifikationsgrad von c-myc und Mlvi-1 beim Vergleich der Tumoren, könnten damit auch in einem unterschiedlichen tumorspezifischen Ursprungsort der verstärkten Replikation liegen.

Da in 10 Osteosarkomen die Amplifikation des c-myc Gens immer mit der des Mlvi-1 Locus auftritt, beruht die Amplifizierung eines bestimmten Bereichs, in diesen Tumoren wahrscheinlich auf einem sehr ähnlichen Mechanismus.

Amplifizierte Gene sind häufig auf speziellen Chromatinstrukturen lokalisiert, den "homogeneously staining regions" (HSRs) und den "double minutes" (DMs) (BIEDLER et al 1983, ALITALO et al 1984a,b, 1985, MÄKELÄ+ALITALO 1986). HSRs sind in einem anormalen Chromosom integriert (Markerchromosom). DMs liegen extrachromosomal vor und werden deshalb bei der Mitose ungleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt.

Vorläufige zytogenetische Untersuchungen des Tumors der Linie TV zeigen DMs und verschiedene Markerchromosomen in den einzelnen Zellen (ADOLPH, persönl. Mit.). Durch die zufallsbedingte Verteilung der DMs kann angenommen werden, daß der Amplifikationsgrad des c-myc Oncogens in den einzelnen Zellen eines Tumors variiert (s.auch MÄKELÄ+ALITALO 1986). Damit erklärt sich der unterschiedliche Amplifikationsgrad des Gens in den einzelnen Generationen und Individuen des Tumors TV (Tab.7).

Die Amplifikation und die erhöhte Expression des c-myc Oncogens ist nur einer der Faktoren in der Tumorgenese der untersuchten, strahleninduzierten Osteosarkome. Frühere EM-Studien hatten in Zellen muriner strahleninduzierter Osteosarkome Intra-zisternale A-Typ-Viruspartikel nachgewiesen (IAP, MARQUART 1974). Die endogenen IAPs

stellen mobile genetische Elemente dar (KUFF et al 1983, CANAANI et al 1983). In den untersuchten Tumoren TV und OTS35/1, mit Koamplifikation des c-myc Gens und des Mlvi-1 Locus, werden diese endogenen retroviralen Sequenzen 5 bis 15-fach stärker als in Kontrollen exprimiert (nicht gezeigt).

5.3. Rearrangement des c-myc Protooncogens im strahleninduzierten Osteosarkom der Transplantatlinie TV

Amplifizierte Oncogene in Tumoren zeigen häufig als zusätzliche genetische Veränderung ein Rearrangement (ALITALO et al 1983, 1984a,b, HAYASHI et al 1983, TRENT et al 1986). In 3 der 10 murinen Osteosarkome (NMRI und Balb/c) konnte gezeigt werden, daß das amplifizierte c-myc Oncogen rearrangiert vorliegt. Die NMRI Transplantatlinie TV wurde als Beispiel gewählt, um das Rearrangement im c-myc Protooncogen (rc-myc) eines strahleninduzierten Osteosarkoms detaillierter zu untersuchen.

Um die Veränderung des c-myc Gens zu definieren, wurden aus dem Tumor der Linie TV ein ca. 20 kb großes EcoRI/EcoRI-Fragment, das das komplette Gen sowie 5' und 3' Sequenzen enthält, kloniert. Dabei wurden 14 Klone isoliert, die sich in zwei verschiedene Typen einteilen lassen (Abb.13).

Die 7 E/E-Fragmente Typ I und die 7 des Typs II, unterscheiden sich in ihrem äußeren 5' Randbereich, der ca. 6 kb 5' vom rc-myc Gen liegt. Dieser Abschnitt ist beim Typ I 2,2 kb groß, beim Typ II 2,7 kb (EcoRI-BglII, Abb.16, 18). Diese typenspezifischen Sequenzen unterscheiden sich im Restriktionsenzymmuster und hybridisieren nicht miteinander. Beim Typ I sind die Restriktionsenzymschnittstellen dieses DNA-Abschnitts möglicherweise identisch mit der Keimbahn-DNA (CORCORAN et al 1984, AKR Maus).

Dagegen ist wahrscheinlich bei beiden Typen der restliche Bereich von

ca. 6 kb, 5' vom rc-myc Gen, in den Restriktionsenzymchnittstellen homolog zur Keimbahn-DNA (BglII-PvuII, Abb.16, 18). Damit ist das 5' Ende des rc-myc Gens, einschließlich seines Kontrollbereichs mit den beiden Promotoren, wahrscheinlich nicht rearrangiert. Kleinere Insertionen oder Deletionen, in der Größe von 50 bp, können jedoch nicht ausgeschlossen werden. Derartige Veränderungen könnten nur durch Sequenzierung bestimmt werden.

Die Analyse des Tumorgenoms TV zeigte, daß wahrscheinlich alle (r)c-myc Gene im 5' Nachbarbereich innerhalb von ca. 6 kb nicht rearrangiert sind (Abb.22).

Die rc-myc Gene der E/E-Fragmente Typ I und Typ II sind in ihren Restriktionsenzymchnittstellen und Hybridisierungseigenschaften identisch (Abb.17, 12, 16). Damit wurde aus dem Tumorgenom in 14 Klonen das gleiche rc-myc Gen isoliert. Das klonierte rc-myc Gen ist im letzten, dem 3. Exon rearrangiert. Dadurch wurde das letzte Drittel des 3. Exons deletiert. Die Bruchstelle liegt innerhalb von 130 bp zwischen der XhoI- und der HindIII-Schnittstelle des 3. Exons (Abb.17). Das Stopcodon der Translation liegt 13 bp 5' der XhoI-Schnittstelle (Stanton et al 1984) und ist möglicherweise im rc-myc Gen vorhanden. Damit wäre der codierende Bereich der mRNA nicht betroffen.

3' der Bruchstelle im 3. Exon liegen fremde, nichthomologe Sequenzen (Abb.18). Diese unterscheiden sich in ihren Restriktionsenzymchnittstellen und Hybridisierungsverhalten innerhalb von ca. 7 kb von der Keimbahn-DNA (XhoI-EcoRI, CORCORAN et al 1984). Durch diese nichthomologe Rekombination wurde das Poly-A-Signal, das 180 bp 3' der HindIII-Schnittstelle im 3. Exon liegt (BERNARD et al 1983), vom rc-myc Gen abgetrennt.

Die Analyse der Exons im Tumorgenom TV zeigte, daß alle (r)c-myc Gene im Promoterbereich einschließlich 2. Intron nicht rearrangiert sind

(Abb.21). Das kartierte rc-myc Gen ist im Tumor TV stark amplifiziert.

Ob im Tumor ein normales c-myc Gen oder weitere rc-myc Gene mit Veränderungen im 3. Exon vorhanden sind, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Im Tumorgenom war es nicht möglich, bei einzelnen rearrangierten Fragmenten zu unterscheiden, ob mit den Proben pSVc-myc 1 und U157/11 myc- oder 3'-Sequenzen hybridisierten (Abb.22). Da jedoch in 14 Klonen die gleichen rc-myc Gene isoliert worden waren, ist anzunehmen, daß das kartierte rc-myc Gen in mindestens 90 % der myc Sequenzen des Tumors TV beinhaltet ist.

Die Untersuchung der Expression des myc Gens im Tumor TV zeigte, daß diese erhöht ist. Die Größe der mRNA von 2,3 kb stimmt mit der der Kontrollen überein (Abb.11).

Die Expression der myc mRNA im Tumor TV kann durch die Transkription eines rc-myc Gens oder eines normalen Gens bedingt sein. Die erhöhte myc-Expression im Tumor TV kann durch die erhöhte Anzahl von Genkopien verursacht werden, oder aber zusätzlich durch ein Rearrangement verursacht sein, das negative Transkriptionskontrollelemente im myc Gen entfernt (BRAWERMAN 1987, CLEMENS 1987). Fremde Enhancersequenzen könnten außerdem die Transkriptionsrate des myc Gens verstärken.

Enhancersequenzen sind Kontrollelemente, die an der cis-Regulation eines Gens beteiligt sind und über einen größeren Bereich den Promoter beeinflussen können (> 3 kb, SERFLING et al 1985). Die Einwirkung eines Immunoglobulin-Enhancers auf das c-myc Gen ist bei einzelnen der charakteristischen Translokationen in Plasmacytomen und in Burkitt Lymphomen beschrieben worden (FAHRLANDER et al 1985, YANG et al 1985, MOAV et al 1986, s.auch HAYDAY et al 1984).

Das kartierte rc-myc Gen ist wahrscheinlich im 5' Bereich identisch mit der Keimbahn-DNA. Jedoch ist mit der verwendeten Methode nicht auszuschließen, daß fremde Enhancersequenzen integriert sind. Um auszuschließen, daß im Tumor TV eine Aktivierung des rc-myc Gens durch

einen fremden Enhancer vorliegt, müßte der 5' Bereich auf transkriptionssteigernde Sequenzen untersucht werden.

Im nichtcodierenden Bereich des 3' Ende verschiedener Gene wurden negative Kontrollsequenzen identifiziert, die die Degradierung der reifen mRNA beeinflussen können (CLEMENS 1987, BRAVERMAN 1987). Die Höhe der mRNA in der Zelle kann beim c-myc Gen posttranskriptional gesteuert werden (DANI et al 1984, PIECHACZYK et al 1985, BLANCHEUR et al 1984). Im kartierten rc-myc Gen des Tumors TV fehlt der nichtcodierende Bereich um das Poly-A-Signal. Möglicherweise wurden durch das Rearrangement negative 3' Kontrollelemente des rc-myc Gens entfernt.

Das Poly-A-Signal und ein zweites 3' Element sind beim Beenden der Transkription und der Polyadenylierung der pre-mRNA beteiligt (FITZGERALD+SHENK 1981, MONTELL et al 1983, McLAUCHLAN et al 1985, ZARKOWER+WICKENS 1987, GIL+PROUDFOOT 1987). Möglicherweise wurden im klonierten rc-myc Gen fremde Transkriptionssignale durch die Rekombination im 3. Exon hinzugefügt. Eine Polyadenylierung der reifen myc mRNA ist dabei nicht notwendig. SWARTWOUT et al (1987) fanden, daß in normalen Zellen und in Tumorzellen zwei verschiedene Populationen an c-myc mRNA vorhanden sein können. Die größere mRNA besitzt einen Poly-(A)* Schwanz, die um 0,2 kb kleinere keinen (nonPoly(A)*). Die Poly(A)*-RNA wird in der Zelle schneller degradiert, als die nonPoly(A)*-RNA.

Für die Expression des c-myc Oncogens kann außerdem der Methylierungsgrad wichtig sein (DUNNICK et al 1984, SAULE et al 1984, s.auch RAZIN+RIGGS 1980, CHANDLER et al 1987).

Möglicherweise wird die Aktivierung der amplifizierten (r)c-myc Gene im Tumor TV ebenfalls über die Methylierung gesteuert. Die XhoI-Schnittstelle im 3. Exon wird im Tumor TV nur teilweise geschnitten (Abb.21IV). Das Restriktionsenzym XhoI kann die DNA nicht schneiden, wenn sein Erkennungspalindrom an der betreffenden Schnittstelle methyliert ist (GINGERAS et al 1987, RAZIN+RIGGS 1980, CHANDLER et al

1987).

5.4. Anordnung der Amplifikationseinheiten im Tumor TV

Der Vorgang der Amplifikation ist nicht geklärt. Eine der Vorstellungen ist das "Zwiebelschalen"-Modell, bei dem ausgehend von einem Ursprungsort der Replikation, der gleiche DNA-Abschnitt immer wieder synthetisiert wird (BOTCHAN et al 1979, ALITALO et al 1984a,b, ROBERTS et al 1983). Diese zusätzlichen Kopien müssen vor der Mitose der Zelle in eine lineare Anordnung gebracht werden (ALITALO 1984a). Meist sind die "Amplifikationseinheiten" sehr groß (> 100 kb, KINZLER et al 1986, ROBERTS et al 1983, HYRIEN et al 1987), so daß die genaue Anordnung in vivo schwierig zu klären ist.

ROBERTS et al (1983) konnte in vitro zeigen, daß amplifizierte Einheiten im Tandem angeordnet werden. Die Rekombination zwischen den Abschnitten erfolgt meist in homologen repetitiven DNA-Sequenzen. Der gesamte amplifizierte Bereich enthält jedoch Deletionen, Insertionen und Inversionen, die durch nichthomologe Rekombinationen erzeugt werden (HYRIEN et al 1987).

Der 5' Randbereich, in dem sich die beiden klonierten E/E-Fragmente Typ I und II des Tumors TV unterscheiden, ist zumindest beim Typ II eine hoch-repetitive Sequenz. Die Hybridisierung der Keimbahn-DNA mit dieser Randsequenz des Typs II, führt zu vielen diskreten Banden, wobei die Hauptbande bei 0,3 kb liegt (Abb.20I). Hoch-repetitive Sequenzen, die bei der Rekombination der amplifizierten Segmente eine Rolle spielen, sind in der Maus und im Menschen in Amplifikationseinheiten gefunden worden (HYRIEN et al 1987). Im Tumor TV sind diese Typ II-spezifischen Randsequenzen auf zwei amplifizierten E/E-Fragmente von 20 kb und 5,3 kb beschränkt (Abb.19III), wobei das größere alle myc-Sequenzen enthält (Abb.3A, 4I,III).

Die Hybridisierungen verschiedener Osteosarkome mit den E/E-Fragmenten

Typ I und II zeigten, daß weitere Sequenzen aus dem Nachbarbereich des klonierten rc-myc Gens ebenfalls auf einer begrenzten Anzahl von Fragmenten liegen. Bei den Tumoren mit amplifizierten c-myc Gen sind Fragmente, die nicht myc-homolog sind, ebenfalls vervielfältigt (Abb.19I,II,IV, Tumoren TV und OTS). Diese Fragmente mit Sequenzen aus dem homologen und nichthomologen Nachbarbereich des rc-myc Gens, sind damit in den Tumoren unabhängig von myc Sequenzen amplifiziert worden. Die Anordnung der Amplifikationseinheiten in den untersuchten Tumoren ist ein komplexer Vorgang. Die Rekombination lief jedoch nicht völlig ungerichtet ab, da selbst die Lokalisation der hoch-repetitiven Sequenzen im Tumor TV, auf zwei amplifizierte E.E-Fragmente beschränkt blieb.

Möglicherweise ist der Mechanismus der Amplifikation bestimmter Segmente ähnlich in allen untersuchten Osteosarkomen mit Koamplifikation des c-myc und des Mlvi-1 Locus. Dabei ist es nicht notwendig, daß Störungen in der DNA diesen Bereich des Genoms direkt treffen. Für die Amplifikation der SV40-Virussequenzen in bestrahlten Hamsterzellen wurde ein trans-Mechanismus verantwortlich gemacht (LÜCKE-HUHLE + HERRLICH 1984, 1987, LÜCKE-HUHLE et al 1986, HERRLICH et al 1987).

Wie in 5.1. diskutiert wurde, ist die Amplifikation des c-myc Gens einschließlich eines großen Bereichs auf dem Chromosom 15, wahrscheinlich ein spätes Ereignis in der Genese des Osteosarkoms. Im untersuchten Tumor TV wurde jedoch eine weitere Veränderung im c-myc Gen gefunden. Das kartierte rc-myc Gen zeigt in allen 14 Klonen das gleiche Rearrangement im 3. Exon. Die Klone lassen sich jedoch in die Typen I und II einteilen. Dies deutet daraufhin, daß das Rearrangement im Gen vor der Amplifikation stattgefunden hat. Möglicherweise war das rearrangierte, nicht kontrollierbare rc-myc Oncogen im Osteosarkom TV einer der Faktoren, die zur Initiation oder Promotion des Tumors

beitrugen. SORRENTINO et al (1987) zeigten, daß die konstitutive, deregulierte Expression eines exogenen myc-Gens erst nach ¹³⁷Cs-Behandlung zur erhöhten Transformationsrate in vitro führte.

Da das c-myc Protooncogen bei der Kontrolle der Zellproliferation beteiligt ist, könnte die Deregulation zum ungehinderten Wachstum der betroffenen Zelle führen (BRAVO+MÜLLER 1986, MOELLING 1986, CLASSON et al 1987).

Methoden, wie die orthogonale Wechselfeldelektrophorese, die die Analysen von DNA-Fragmenten größer 20 kb erlauben, könnten möglicherweise den amplifizierten Bereich 5' und 3' des c-myc Protooncogens und des Mlvi 1-Locus genauer definieren. Dies könnte zur Identifizierung weiterer betroffener Genorte auf dem Chromosom 15 führen. Möglicherweise ist ein Genort beteiligt, der spezifisch zur Tumorgenese des Osteosarkoms beiträgt.

6. Zusammenfassung

Die molekularbiologische Untersuchung muriner, strahleninduzierter Osteosarkome zeigte, daß das c-myc Oncogen häufig amplifiziert ist. Ein Rearrangement des amplifizierten Gens tritt zusätzlich bei einem Teil der Tumoren auf. Die Amplifikation des c-myc Gens führte zur erhöhten Expression.

Zusätzlich zum c-myc Genort sind weitere Bereiche des Chromosoms 15 amplifiziert. Tumoren mit amplifiziertem c-myc Gen zeigten eine Koamplifikation des Mlvi-1 Locus.

Das Osteosarkom der Transplantatlinie TV wurde als Beispiel gewählt, um ein Rearrangement des c-myc Gens im Tumor genauer zu bestimmen.

EcoRI/EcoRI-Fragmente von ca. 20 kb aus dem Tumor TV389/1, die das myc Gen einschließlich 5' und 3' Sequenzen enthielten, wurden kloniert und subkloniert.

In 14 Klonen wurden ausschließlich E/E-Fragmente vom Typ I und vom Typ II gefunden. Beide Typen unterscheiden sich ihrer Randsequenz, die ca. 6 kb 5' vom Promoterbereich des myc Gens liegt. Diese Sequenz des E/E-Fragments Typ II ist in der Keimbahn-DNA hoch-repetitiv.

Der 5' Nachbarbereich des Gens ist möglicherweise bei beiden Typen, innerhalb von 6 kb, in den Restriktionsenzymschnittstellen identisch mit der Keimbahn-DNA.

Das rearrangierte Gen (rc-myc) der E/E-Fragmente Typ I und II ist identisch und weist eine Bruchstelle im letzten Exon auf. 3' dieser Bruchstelle im 3. Exon sind die Sequenzen nicht mehr homolog zur Keimbahn-DNA. Diese Rekombination mit fremden Sequenzen führte im rc-myc Gen wahrscheinlich zum Verlust des nichtcodierenden Bereichs um das Poly-A-Signal.

5' der Bruchstelle im 3. Exon ist das rc-myc Gen, einschließlich des Promoterbereichs, in den Restriktionsenzymschnittstellen und im

Hybridisierungsverhalten mit der Keimbahn-DNA identisch.

Im Genom des Tumors TV ist das kartierte *rc-myc* Gen stark amplifiziert. Mögliche normale oder weitere rearrangierte *myc* Gene liegen, falls vorhanden, im Tumor TV zu einem geringeren Anteil vor. Wahrscheinlich sind alle (r)*c-myc* Gene im Tumor innerhalb des Promoterbereichs und dem 2. Intron nicht rearrangiert.

Der 5' Nachbarbereich ist möglicherweise, innerhalb von ca. 6 kb, bei allen (r)*c-myc* Genen im Tumor TV identisch mit der Keimbahn.

Im Genom des Tumors TV und der anderen untersuchten Osteosarkome mit amplifiziertem *myc* Gen, sind die Nachbarsequenzen unabhängig von *myc* Sequenzen amplifiziert.

7. Literatur

- Adams J.M., Gerondakis S., Webb E., Mitchell J., Bernard O., Cory S. (1982). Transcriptionally active DNA region that rearranges frequently in murine lymphoid tumors. *PNAS* **79**, 6966-6970.
- Adams J.M., Gerondakis S., Webb E., Corcoran L.M., Cory S. (1983). Cellular myc oncogene is altered by chromosome translocation to an immunoglobulin locus in murine plasmacytomas and is rearranged similarly in human Burkitt lymphomas. *PNAS* **80**, 1982-1986.
- Adolph S., Bartram C.R., Hameister H. (1987). Mapping of the oncogenes Myc, Sis, and int-1 to the distal part of mouse chromosome 15. *Cytogenet.Cell.Genet.* **44**, 65-68.
- Adolph S., Strauss P.G., Hamelster H. (subm.). Localisation of proviral sites (Mlvi-1, Mlvi-2, Pvt-1) and the α -globin pseudogene Hba-3ps on murine chromosome 15. *Cytogenet.Cell.Genet.*
- Alitalo K., Schwab M., Lin C.C., Varmus H.E., Bishop J.M. (1983). Homogeneously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (c-myc) in colon carcinoma. *PNAS* **80**, 1707-1711.
- Alitalo K. (1984a). Amplifikation of cellular oncogenes in cancer cells. *Med.Biol.* **62**, 304-317.
- Alitalo K., Saksela K., Winqvist R., Schwab M., Bishop J.M. (1984b). Amplification and aberrant expression of cellular oncogenes in human colon cancer cells. In: *Genes and Cancer*. Alan R. Liss, Inc., New York 10011. 383-397.
- Alitalo K., Winqvist R., Keski-Oja J., Ilvonen M., Saksela K., Alitalo R., Laiho M., Knuutila S., De la Chapelle A. (1985). Acute myelogenous leukaemia with c-myc amplification and double minute chromosomes. *Lancet* **9**, 1035-1039.
- Barbacid M. (1986). Mutagens, oncogenes and cancer. *Trends Genet.* July 1986, 188-192.
- Batley J., Moulding C., Taub R., Murphy W., Stewart T., Potter H., Lenoir G., Leder P. (1983). The human c-myc oncogene: Structural consequences of translocation into IgH Locus in Burkitt Lymphoma. *Cell* **34**, 779-787.
- Bender M.A. (1984). Significance of chromosome abnormalities. In: *Radiation Carcinogenesis: Epidemiology and Biological Significance*. Eds. Boice J.D. et al. Raven Press, New York.
- Benton W.D., Davis R.W. (1977). Screening λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science* **196**, 180-182.
- Bernard O., Cory S., Gerondakis S., Webb E., Adams J.M. (1983). Sequence of the murine and human cellular myc oncogenes and two modes of myc transcription resulting from chromosome translocation in B lymphoid tumours. *EMBO* **2**, 2375-2383.
- Beveren van C., Straaten van F., Galleshaw J.A., Verma I.M. (1981).

Nucleotide sequence of the genome of a murine sarcoma virus. *Cell* **27**, 97-108.

Biedler J.L., Meyers M.B., Spengler B.A. (1983). Homogeneously staining regions and double minute chromosomes, prevalent cytogenetic abnormalities of human neuroblastoma cells. *Ad.Cell.Neurobiol.* **4**, 267-306.

Birnboim H.C., Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513.

Bishop J.M. (1985). Trends in oncogenes. *Trends Genet. Sep.* 1985, 245-249.

Bishop J.M. (1987). The molecular genetics of cancer. *Science* **235**, 305-311.

Blanchard J.-M., Piechaczyk M., Dani C., Chambard J.-C., Franchi A., Pouyssegur J., Jeanteur P. (1985). c-myc gene is transcribed at high rate in Go-arrested fibroblasts and is post-transcriptionally regulated in response to growth factors. *Nature* **317**, 443-445.

Botchan M., Topp W., Sambrook J. (1979). Studies on simian virus 40 excision from cellular chromosomes. In: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. Vol XLIII, Cold Spring har. Lab., 709-719.

Bravo R., Müller R. (1986). Involvement of proto-oncogenes in growth control: The induction of c-fos and c-myc by growth factors. In: *Oncogenes and Growth Control*. Eds. Kahn P., Graf T., Springer-Verlag, Berlin, 253-258.

Brawerman G. (1987). Determinants of messenger RNA stability. *Cell* **48**, 5-6.

Campbell A. (1971). Genetic structure. In: *The bacteriophage lambda*. Ed. Hershey A.D., Cold Spring Harbor Lab., New York. 13.

Canaani E., Dreazen O., Klar A., Rechavi G., Ram D., Cohen J.B., Givol D. (1983). Activation of the c-mos oncogene in a mouse plasmacytoma by insertion of an endogenous intracisternal A-particle genome. *PNAS* **80**, 7118-7122.

Carmichael G.G., McMaster G.K. (1980). The analysis of nucleic acids in gels using glyoxal and acridine orange. *Methods Enzymol.* **65**, 380-391.

Cesarman E., Dalla-Favera R., Bentley D., Groudine M. (1987). Mutations in the first exon are associated with altered transcription of c-myc in Burkitt Lymphoma. *Science* **238**, 1272-1275.

Chandler L.A., Ghazi H., Jones P.A., Boukamp P., Fusenig N.E. (1987). Allele-specific methylation of the human c-Ha-ras-1 gene. *Cell* **50**, 711-717.

Chirgwin J.M., Przybyla A.E., MacDonald R.J., Rutter W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem.* **18**, 5294.

Clarke L., Carbon J. (1976). A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire E.coli genome. *Cell* **9**, 91-99.

Classon M., Henriksson M., Sümegi J., Klein G., Hammaskjöld M.-L. (1987). Elevated c-myc expression facilitates the replication of SV40 DNA in human lymphoma cells. *Nature* **330**, 272-274.

Clemens M.J. (1987). A Potential Role for RNA Transcribed from B2 Repeats in the Regulation of mRNA Stability. *Cell* **49**, 157-158.

Cohen J.B., Unger T., Rechavi G., Canaani E., Givol D. (1983). Rearrangement of the oncogene c-mos in mouse myeloma NSI and hybridomas. *Nature* **306**, 797-799.

Cohen S.N., Chang A.C., Hsu L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *E.coli* by R-factor DNA. *PNAS* **69**, 2110-2114.

Cole M.D. (1986). The myc oncogene: its role in transformation and differentiation. *Ann.Rev.Genet.* **20**, 361-384.

Corcoran L.M., Adams J.M., Dunn A.R., Cory S. (1984). Murine T lymphomas in which the cellular myc oncogene has been activated by retroviral insertion. *Cell* **37**, 113-122.

Corcoran L.M., Cory S., Adams J.M. (1985). Transposition of the immunoglobulin heavy chain enhancer to the myc oncogene in a murine plasmacytoma. *Cell* **40**, 71-79.

Crews S., Barth R., Hood L. (1982). Mouse c-myc oncogene is located on chromosome 15 and translocated to chromosome 12 in plasmacytomas. *Science* **218**, 1319-1321.

Croce C.M., Nowell P.C. (1985). Molecular basis of human B cell neoplasia. *Blood* **65**, 1-7.

Croce C.M. (1987). Role of chromosome translocations in human neoplasia. *Cell* **49**, 155-156.

Dalla-Favera R., Gelmann E.P., Martinotti S., Franchini G., Papas T., Gallo R.C., Wong-Staal F. (1982a). Cloning and characterisation of different human sequences related to the onc gene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus (MC29). *PNAS* **79**, 6497-6501.

Dalla-Favera R., Bregni M., Erikson J., Patterson D., Gallo R.C., Croce C.M. (1982b). Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *PNAS* **79**, 7824-7827.

Dani C., Blanchard J.M., Piechaczyk M., ElSabouty S., Marty L., Jeanteur P. (1984). Extreme instability of myc mRNA in normal and transformed human cells. *PNAS* **81**, 7046-7050.

Duesberg P.H. (1983). Retroviral transforming genes in normal cells? *Nature* **304**, 219-226.

Duesberg P.H. (1987). Cancer genes: Rare recombinants instead of activated oncogenes (A Review). *PNAS* **84**, 2117-2124.

Dunnick W., Baumgartner J., Fradkin L., Schultz C. (1984). DNA sequences involved in the rearrangement and expression of the murine c-myc gene. In: *Curr.Top.Microbiol.Imm.* Vol.113, Springer-Verlag Berlin, 154-160.

Dyson P.J., Rabbitts T.H. (1985). Chromatin structure around the c-myc gene in Burkitt lymphomas with upstream and downstream translocation points. *PNAS* **82**, 1984-1988.

Edgell M.H., Weaver N., Haigwood N., Hutchison C.A. (1979). Gene enrichment. In: Genetic engineering. Eds. Setlow J.K. et al, Vol 1,37. Plenum Press, New York.

Ehrfeld A., Planas-Bohne F., Lücke-Huhle C. (1986). Amplification of oncogenes and integrated SV40 sequences in mammalian cells by the decay of incorporated Iodine-125. *Rad.Res.* **108**, 43-51.

Erfle V., Schulte-Overberg S., Marquart K.-H., Adler I.-D., Luz A. (1979). Establishment and characterization of C-type RNA virus-producing cell lines from radiation-induced murine osteosarcomas. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* **94**, 149-162.

Erfle V. (1981). Experimentelle Untersuchungen über Vorkommen und Eigenschaften von C-Typ Retroviren bei strahleninduzierten Osteosarkomen der Maus. GSF-Bericht B 1388 ISSN 0721-1694.

Erikson J., Finger L., Sun L., Ar-Rushdi A., Nishikura K., Minovada J., Finan J., Emanuel B.S., Nowell P.C., Croce C.M. (1986). Deregulation of c-myc by translocation of the α -locus of the T-cell receptor in T-cell leukemias. *Science* **232**, 884-886.

Eva A., Robbins K.C., Andersen P.R., Srinivasan A., Tronick S.R., Reddy E.P., Ellmore N.W., Galen A.T., Lautenberger J.A., Papas T.S., Westin E.H., Wong-Staal F., Gallo R.C., Aaronson S.A. (1982). Cellular genes analogous to retroviral onc genes are transcribed in human tumour cells. *Nature* **295**, 116-119.

Fahrlander P.D., Sümegi J., Yang J.-Q., Wiener F., Marcu K.B., Klein G. (1985). Activation of the c-myc oncogene by the immunoglobulin heavy-chain gene enhancer after multiple switch region-mediated chromosome rearrangements in a murine plasmacytoma. *PNAS* **82**, 3746-3750.

Fainstein E., Marcelle C., Rosner A., Canaani E., Gale R.P., Drexler O., Smith S.D., Croce C.M. (1987). A new fused transcript in Philadelphia chromosome positive acute lymphocytic leukaemia. *Nature* **330**, 386-388.

Fearon E.R., Hamilton S.R., Vogelstein B. (1987). Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science* **238**, 193-197.

Finger L.R., Harvey R.C., Moore R.C.A., Showe L.C., Croce C.M. (1986). A common mechanism of chromosomal translocation in T- and B-cell neoplasia. *Science* **234**, 982-985.

Fitzgerald M., Shenk T. (1981). The sequence 5'-AAUAAA-3' forms part of the recognition site for polyadenylation of late SV40 mRNA. *Cell* **24**, 251-260.

Forrester K., Almoguera C., Han K., Grizzle W.E., Perucho M. (1987). Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature* **327**, 298-303.

Frischauf A., Lehrach H., Poustka A., Murray N. (1983). Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J.Mol.Biol.* **170**, 827-842.

- Gattoni-Celli S., Hsiao W.W., Weinstein I.B. (1983). Rearranged c-mos locus in a MOPC 21 murine myeloma cell line and its persistence in hybridomas. *Nature* 306, 795-796.
- Gelmann E.P., Wong-Staal F., Kramer R.A., Gallo R.C. (1981). Molecular cloning and comparative analyses of the genomes of simian sarcoma virus and its associated helper virus. *PNAS* 78, 3373-3377.
- Gil A., Proudfoot N.J. (1987). Position-dependent sequence elements downstream of AAUAAA are required for efficient rabbit β -globin mRNA 3' end formation. *Cell* 49, 399-406.
- Gingeras T.R., Myers P.A., Olson J.A., Hanberg F.A., Roberts R.J. (1978). *J.Mol.Biol.* 118, 113-122.
- Gisselbrecht S., Fichelson S., Sola B., Bordereaux D., Hampe A., Andre C., Galibert F., Tambourin P. (1987). Frequent c-fms activation by proviral insertion in mouse myeloblastic leukaemias. *Nature* 329, 259-261.
- Gould M.N. (1984). Radiation initiation of carcinogenesis in vivo: a rare or common cellular event. In: *Radiation Carcinogenesis: Epidemiology and Biological Significance*. Raven Press, New York.
- Graham M., Adams J.M. (1986). Chromosome 8 breakpoint far 3' of the c-myc oncogene in a Burkitt's lymphoma 2;8 variant translocation is equivalent to the murine pvt-1 locus. *EMBO* 5, 2845-2851.
- Graves D.T., Owen A.J., Barth R.K., Tempst P., Winoto A., Fors L., Hood L.E. (1984). Detection of c-sis transcripts and synthesis of PDGF-like proteins by human osteosarcoma cells. *Science* 226, 972-974.
- Guerrero I., Calzava P., Mayer A., Pellicer A. (1984a). A molecular approach to leukemogenesis: Mouse lymphomas contain an activated c-ras oncogene. *PNAS* 81, 202-205.
- Guerrero I., Villasante A., Corces V., Pellicer A. (1984b). Activation of a c-K-ras oncogene by somatic mutation in mouse lymphomas induced by gamma radiation. *Science* 225, 1159-1162.
- Hagen U. (1986). Current aspects on the radiation induced base damage in DNA. *Radiat.Environ.Biophys.* 25, 261-271.
- Harris L.J., D'Eustachio P., Ruddle F.H., Marcu K.B. (1982). DNA sequence associated with chromosome translocations in mouse plasmacytomas. *PNAS* 79, 6622-6626.
- Hartl P., Lipp M. (1987). Generation of a variant t(2;8) translocation of burkitt's lymphoma by site-specific recombination via the kappa light-chain joining signals. *Mol.Cell.Biol.* 7, 2037-2045.
- Hayashi K., Kakizoe T., Sugimura T. (1983). In vivo amplification and rearrangement of the c-HA-RAS-1 sequence in a human bladder carcinoma. *Gann* 74, 798-801.
- Hayday A.C., Gillies S.D., Saito H., Wood C., Wiman K., Hayward W.S., Tonegawa S. (1984). Activation of a translocated human c-myc gene by an enhancer in the immunoglobulin heavy-chain locus. *Nature* 307, 334-340.
- Hayward W.S., Neel B.G., Astrin S.M. (1981). Activation of a cellular

onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukemia. *Nature* **290**, 475-480.

Heim S., Mitelman F. (1987). Nineteen of 26 cellular oncogenes precisely localized in the human genome map to one of the 83 bands involved in primary cancer-specific rearrangements. *Hum.Genet.* **75**, 70-72.

Helling R.B., Goodman H.M., Boyer H.W. (1974). Analysis of R.EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J.Virol.* **14**, 1235.

Herbst E.W., Gropp A. (1982). Relevance of trisomy 15 and other chromosome abnormalities in spontaneous AKR leukemia of mice with and without Robertsonian rearrangement. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* **104**, 207-218.

Herrlich P., Imagawa M., Maher V., Sato K., McCormick J.J., Angel P., Karin M., Baumann I., Lücke-Hühle C., Rahmsdorf H.J. (1987). The molecular basis for the uv response: cis and trans acting elements responsible for gene induction. In: Accomplishments in Oncology. Eds. zur Hausen H. et al, Philadelphia.

Hirai H., Kobayashi Y., Mano H., Hagiwara K., Maru Y., Omine M., Mizoguchi H., Nishida J., Takaku F. (1987). A point mutation at codon 13 of the N-ras oncogene in myelodysplastic syndrome. *Nature* **327**, 430-432.

Hohn B., Murray K. (1977). Packaging recombinant DNA molecules into bacteriophage particles in vitro. *PNAS* **74**, 3259-3263.

Hohn B., Collins J. (1980). A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. *Gene* **11**, 291.

Holmes D.S., Quingley M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal.Biochem.* **114**, 193.

Howley P.M., Israel M.A., Law M.-F., Martin M.A. (1979). A rapid method for detecting and mapping homology between heterologous DNAs (1979). *J.Biol.Chem.* **254**, 4876-4883.

Hunter T. (1984). Die Proteine der Onkogene. *Spektrum der Wissenschaft Okt.84*, 106-119.

Hyman R.W., Brunovskis I., Summers W.C. (1973). *J.Mol.Biol.* **77**, 189-196.

Hyrien O., Debatisse M., Buttin G., Vincent B.R. (1987). A hotspot for novel amplification joints in a mosaic of Alu-like repeats and palindromic A+T-rich DNA. *EMBO* **6**, 2401-2408.

Kelly R.G., Cozzarelli N., Deutscher M.P., Lehman I.R., Kornberg A. (1970). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. *J.Biol.Chem.* **245**, 39.

Kingston R.E., Baldwin A.S., Sharp P.A. (1985). Transcription Control by Oncogenes. *Cell* **41**, 3-5.

Kinzler K.W., Zehnbauser B.A., Brodeur G.M., Seeger R.C., Trent J.M., Meltzer P.S., Vogelstein B. (1986). Amplification units containing human N-myc and c-myc genes. *PNAS* **83**, 1031-1035.

Klein G. (1981). The role of gene dosage and genetic transpositions in

carcinogenesis. *Nature* **294**, 313-318.

Klein G. (1983). Specific chromosomal translocations and the genesis of B-cell-derived tumors in mice and men. *Cell* **32**, 311-315.

Kolata G. (1987). Research news. Oncogenes give breast cancer prognosis. *Science* **235**, 160-161.

Kozak C.A., Sears J.F., Hoggan M.D. (1983). Genetic mapping of the mouse proto-oncogene *c-sis* to chromosome 15. *Science* **221**, 867-869.

Kozak C.A., Strauss P.G., Tsichlis P.N. (1985). Genetic mapping of a cellular DNA region involved in induction of thymic lymphomas (Mlvi-1) to mouse chromosome 15. *Mol.Cell.Biol.* **5**, 894-897.

Kuff E.L., Feenstra A., Lueders K., Smith L., Hawley R., Hozumi N., Shulman M. (1983). Intracisternal A-particle genes as movable elements in the mouse genome. *PNAS* **80**, 1992-1996.

Lambda II (1983). Eds. Hendrix R.W. et al, Cold Spring Har. Lab., 683.

Land H., Parada L.F., Weinberg R.A. (1983). Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* **304**, 596-602.

Leder A., Swan D., Ruddle F., D'Eustachio P., Leder P. (1981). Dispersion of α -like globin genes of the mouse to three different chromosomes. *Nature* **293**, 196-200.

Lenoir G.M., Preud'homme J.L., Bernheim A., Berger R. (1982). Correlation between immunoglobulin light expression and variant translocation in Burkitt's lymphoma. *Nature* **298**, 474-476.

Li Y., Holland C.A., Hartley J.W., Hopkins N. (1984). Viral integration near *c-myc* in 10-20 % of MCF 247-induced AKR lymphomas. *PNAS* **81**, 6808-6811.

Lin C.C., Alltalo K., Schwab M., George D., Varmus H.E., Bishop J.M. (1985). Evolution of karyotypic abnormalities and C-MYC oncogene amplification in human colonic carcinoma cell lines. *Chromosoma* **92**, 11-15.

Lipp M., Schilling R., Wiest S., Laux G., Bornkamm G.W. (1987). Target sequences for cis-acting regulation within the dual promoter of the *c-myc* gene. *Mol.Cell.Biol.* **7**, 1393-1400.

Little C.D., Nau M.M., Carney D.N., Gazdar A.F., Minna J.D. (1983). Amplification and expression of the *c-myc* oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature* **306**, 194-196.

Liu E., Hjelle B., Morgan R., Hecht F., Bishop J.M. (1987). Mutations of the Kirsten-ras proto-oncogene in human preleukaemia. *Nature* **300**, 186-188.

Lücke-Huhle C., Herrlich P. (1984). Gene amplification in mammalian cells after exposure to ionizing radiation and uv. In: Proceedings of ASI-Meeting on Radiation Carcinogenesis, Corfu.

Lücke-Huhle C., Pech M., Herrlich P. (1986). Selective gene amplification in mammalian cells after exposure to ^{60}Co gamma rays,

²⁴¹Am α particles, or uv light. Rad.Res. 106, 345-355.

Lücke-Huhle C., Herrlich P. (1987). Alpha-radiation-induced amplification of integrated SV40 sequences is mediated by a trans-acting mechanism. Int.J.Cancer 39, 94-98.

Luz A. (1980). Zur Pathogenese des strahleninduzierten Osteosarkoms. Habilitationsschrift. GSF-Bericht B 1387 ISSN 0721-1694.

Mäkelä T.P., Alitalo K. (1986). Proto-oncogene amplification: Role in tumour progression. Ann.Clin.Res. 18, 290-296.

Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. (1982). Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab., New York.

Marcu K.B., Yang J.O., Stanton L.W., Mushinski J.F., Fahrlander P.D., Eckhardt L.W., Birshtein B.K. (1985). Activation of the c-myc oncogene in murine plasmacytomas. In: Molecular Biology of Tumor Cells. Eds. Wahren B. et al, Raven Press, New York.

Marmur J., Doty P. (1962). Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. J.Mol.Biol. 5, 109.

Marquart K.-H. (1974). Virus-like particles in ²²⁴Ra-induced murine osteosarcomas. Beitr.Path.Bd. 152, 116-126.

Matocha M.F., Cosgrove J.W., Atack J.R., Rapoport S.I. (1987). Selective elevation of c-myc transcript levels in the liver of the aging Fischer-344 rat. Biochem.Biophys.Res.Comm. 147, 1-7.

Mays C.W., Spiess H. (1984). Bone sarcomas in patients given Radium-224. In: Radiation Carcinogenesis. Eds. Boice J.D. et al. Raven Press, New York.

Mays C.W., Spiess H., Chmelevsky D., Kellerer A. (1986). Bone sarcoma cumulative tumor rates in patients injected with Ra²²⁴. In: The Radiobiology of Radium and Thorotrast. Suppl. Strahlentherapie Vol. 80, 27-31.

McConaughy B.L., Laird C.D., McCarthy B.J. (1969). Nucleic acid reassociation in formamide. Bio.Chem. 8, 3289.

McDonnell M.W., Simon M.N., Studier F.W. (1977). Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. J.Mol.Biol. 110, 119.

McKeithan T.W., Shima E.A., LeBeau M.M., Minowada J., Rowley J.D., Diaz M.O. (1986). Molecular cloning of the breakpoint junction of a human chromosomal 8;14 translocation involving the T-cell receptor α -chain gene and sequences on the 3' side of MYC. PNAS 83, 6636-6640.

McLauchlan J., Gaffney D., Whitton J.L., Clements J.B. (1985). The consensus sequence YGTGTTY located downstream from the AATAAA signal is required for efficient formation of mRNA 3' termini. Nuc.Acids Res. 13, 1347-1368.

McMaster G.K., Carmichael G.G. (1977). Analysis of single and double-stranded nucleic acids on polyacrilamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. PNAS 74, 4835-4838.

Miller D.A., Miller O.J. (1983). Chromosomes and cancer in the mouse: Studies in tumors, established cell lines, and cell hybrids. *Ad.Can.Res.* **39**, 153-182.

Mitelman F. (1984). Restricted number of chromosomal regions implicated in aetiology of human cancer and leukaemia. *Nature* **310**, 325-327.

Mizuki K., Nose K., Okamoto H., Tsuchida N., Hayashi K. (1985). Amplification of c-Ki-ras gene and aberrant expression of c-myc in WI-38 cells transformed in vitro by gamma radiation. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **128**, 1037-1043.

Moav B., Horowitz M., Cohen J.B., Rechavi G., Eliyahu E., Oren M., Givol D. (1986). Structure and activity of the translocated c-myc in mouse plasmacytoma XRPC-24. *Gene* **48**, 297-300.

Modjtahedi N., Laviaille C., Poupon M.F., Landin R.-M., Cassingena R., Monier R., Brison O. (1985). Increased level of amplification of the c-myc oncogene in tumors induced in nude mice by a human breast carcinoma cell line. *Cancer Res.* **45**, 4372-4379.

Moelling K. (1986). Properties of the myc and myb gene products. In: *Oncogenes and Growth Control*. Springer-Verlag, Berlin, 271-277.

Möröy T., Marchio A., Etiemble J., Trepo C., Tiollais P., Buendia M.-A. (1986). Rearrangement and enhanced expression of c-myc in hepatocellular carcinoma of hepatitis virus infected woodchucks. *Nature* **324**, 276-279.

Monnat M., Tardy S., Saraga P., Diggelmann H., Costa J. (1987). Prognostic implications of expression of the cellular genes myc, fos, Ha-ras and Ki-ras in colon carcinoma. *Int.J.Cancer* **40**, 293-299.

Montell C., Fisher E.F., Caruthers M.H., Berk A.J. (1983). Inhibition of RNA cleavage but not polyadenylation by a point mutation in mRNA 3' consensus sequence AAUAAA. *Nature* **305**, 600-605.

Moos M., Gallwitz D. (1983). Structure of two β -actin-related processed genes one of which is located next to a simple repetitive sequence. *EMBO* **2**, 757-761.

Müller W.A., Luz A., Schäffer E.H. (1986). The osteosarcomogenic efficiency of low 224 Radium-doses in mice compared to that of the short-lived beta-emitting rare earth 177 Lutetium. In: *The Radiobiology of Radium and Thorotrast*. Suppl. *Strahlentherapie* Vol. **80**, 79-82.

Neel B.G., Jhanwar S.C., Chaganti R.S., Hayward W.S. (1982). Two human c-onc genes are located on the long arm of chromosome 8. *PNAS* **79**, 7842-7846.

Nepveu A., Marcu K.B. (1986). Intragenic pausing and anti-sense transcription within the murine c-myc locus. *EMBO* **5**, 2859-2865.

Painter R.B., Young B.R. (1987). DNA synthesis in irradiated mammalian cells. *J.Cell Sci.Suppl.* **6**, 207-214.

Perry R.P. (1983). Consequences of myc invasion of immunoglobulin loci: Facts and speculation. *Cell* **33**, 647-649.

Piechaczyk M., Yang J.-Q., Blanchard J.-M., Jeanteur P., Marcu K.B. (1985). Posttranscriptional mechanisms are responsible for accumulation

of truncated c-myc RNAs in murine plasma cell tumors. *Cell* **42**, 589-597.

Rabbitts T.H., Forster A., Hamlyn P., Baer R. (1984). Effect of somatic mutation within translocated c-myc genes in Burkitt's lymphoma. *Nature* **309**, 592-597.

Rabbitts T.H. (1985). The c-myc proto-oncogene: involvement in chromosomal abnormalities. *Trends Genet.* **Dec. 1985**, 327-331.

Rapp U., Goldsborough M.D., Mark G.E., Bonner T.I., Groffen J., Reynolds F.H., Stephenson J.R. (1983). Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *PNAS* **80**, 4218-4222.

Razin A., Riggs A.D. (1980). DNA methylation and gene function. *Science* **210**, 604-610.

Rechavi G., Glivol D., Canaanl E. (1982). Activation of a cellular oncogene by DNA rearrangement: possible involvement of an IS-like element. *Nature* **300**, 607-611.

Remmers E.F., Yang J.-Q., Marcu K.B. (1986). A negative transcriptional control element located upstream of the murine c-myc gene. *EMBO* **5**, 899-904.

Roberts J.M., Buck L.B., Axel R. (1983). A structure for amplified DNA. *Cell* **33**, 53-63.

Roberts R. (1982). Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. *Nucleic Acids Res.* **10**, R117-167.

Rosson D., Dugan D., Reddy E.P. (1987). Aberrant splicing events that are induced by proviral integration: Implications for myb oncogene activation. *PNAS* **84**, 3171-3175.

Rowley J.D. (1983). Human oncogene locations and chromosome aberrations. *Nature* **301**, 290-291.

Sassone-Corsi P., Borrelli E. (1986). Transcriptional regulation by trans-acting factors. *Trends Genet.* **Aug. 1986**, 215-219.

Saule S., Martin P., Gegonne A., Begue A., Lagrou C., Stehelin D. (1984). Increased transcription of the c-myc oncogene in two Methylcholanthrene-induced quail fibroblastic cell lines. *Exp.Cell Res.* **155**, 496-506.

Sawey M.J., Hood A.T., Burns F.J., Garte S.J. (1987). Activation of c-myc and c-K-ras oncogenes in primary rat tumors induced by ionizing radiation. *Mol.Cell.Biol.* **7**, 932-935.

Schimke R.T., Sherwood S.W., Hill A.B., Johnston R.N. (1986). Overreplication and recombination of DNA in higher eukaryotes: Potential consequences and biological implications. *PNAS* **83**, 2157-2161.

Schmidt J., Erfle V. (1984). Elimination of mycoplasmas from cell cultures and establishment of mycoplasma-free cell lines. *Exp.Cell.Res.* **152**, 565-569.

Schön A., Michiels L., Janowski M., Merregaert J., Erfle V. (1986). Expression of Protooncogenes in murine Osteosarkomas. *Int.J.Cancer* **38**, 67-74.

Schwab M., Alitalo K., Varmus H.E., Bishop J.M., George D. (1983). A cellular oncogene (c-Ki-ras) is amplified, overexpressed, and located within karyotypic abnormalities in mouse adrenocortical tumour cells. *Nature* **303**, 497-591.

Schwab M., Ramsay G., Alitalo K., Varmus H.E., Bishop J.M., Martinsson T., Levan G., Levan A. (1985). Amplification and enhanced expression of the c-myc oncogene in mouse SEWA tumour cells. *Nature* **315**, 345-347.

Seeger R.C., Brodeur G.M., Sather H., Dalton A., Siegel S.E., Wong K.Y., Hammond D. (1985). Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N.Engl.J.Med.* **313**, 1111-1116.

Selten G., Cuypers H.T., Zijlstra M., Melief C., Berns A. (1984). Involvement of c-myc in MuLV-induced T cell lymphomas in mice: frequency and mechanisms of activation. *EMBO* **3**, 3215-3222.

Serfling E., Jasin M., Schaffner W. (1985). Enhancers and eukaryotic gene transcription. *Trends Genet.*, August 1985, 224-230.

Sharp P.A., Sugden B., Sambrook J. (1973). Detection of two restriction endonuclease activity in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose. *Biochemistry* **12**, 3055.

Shaw G., Kamen R. (1986). A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* **46**, 659-667.

Shen-Ong G.L., Keath E.J., Piccoli S.P., Cole M.D. (1982). Novel myc oncogene RNA from abortive immunoglobulin-gene recombination in mouse plasmacytomas. *Cell* **31**, 443-452.

Shibuya M., Yokota J., Ueyama Y. (1985). Amplification and expression of a cellular oncogene (c-myc) in human gastric adenocarcinoma cells. *Mol.Cell.Biol.* **5**, 414-418.

Shimizu K., Birnbaum D., Ruley M.A., Fasano O., Suard Y., Edlund L., Taparowsky E., Goldfarb M., Wigler M. (1983). Structure of the Ki-ras gene of the human lung carcinoma cell line Calu-1. *Nature* **304**, 497-500.

Short N.J. (1987). Are some controlling factors more equal than others? *Nature* **326**, 740-741.

Showe L.C., Moore R.C., Erikson J., Croce C.M. (1987). MYC oncogene involved in a t(8;22) chromosome translocation is not altered in its putative regulatory regions. *PNAS* **84**, 2824-2828.

Shtivelman E., Lifshitz B., Gale R.P., Roe B.A., Canaan E. (1986). Alternative splicing of RNAs transcribed from the human *abl* gene and from the *bcr-abl* fused gene. *Cell* **47**, 277-284.

Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G., Levin W.J., Ullrich A., McGuire W.L. (1987). Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **235**, 177-182.

Sorrentino V., Drozdoff V., Zeitz L., Fleissner E. (1987). Increased radiation-induced transformation in C3H/10T^{1/2} cells after transfer of an exogenous c-myc gene. *PNAS* **84**, 4131-4134.

Southern E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments

separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* **98**, 503-517.

Spieß H., Mays C.W. (1970). Bone cancer induced by ^{224}Ra (Th X) in children and adults. *Health Phys.* **19**, 713-729.

Stanton L.W., Watt R., Marcu K.B. (1983). Translocation, breakage and truncated transcripts of c-myc oncogene in murine plasmacytomas. *Nature* **303**, 401-406.

Stanton L.W., Fahrlander P.D., Tesser P.M., Marcu K.B. (1984). Nucleotide sequence comparison of normal and translocated murine c-myc genes. *Nature* **310**, 423-425.

Steffen D. (1984). Provirus are adjacent to c-myc in some murine leukemia virus-induced lymphomas. *PNAS* **81**, 2097-2101.

Sternberg N., Tiemeier D., Enquist L. (1977). In vitro packaging of a λ dam vector containing EcoRI DNA fragments of *Escherichia coli* and phage ϕ . *Gene* **1**, 255.

Swartwout S.G., Preisler H., Guan W., Kinniburgh A.J. (1987). Relatively stable population of c-myc RNA that lacks long Poly(A). *Mol.Cell.Biol.* **7**, 2052-2058.

Tabin C.J., Bradley S.M., Bargmann C.I., Weinberg R.A., Papageorge A.G., Scolnick E.M., Dhar R., Lowy D.R., Chang E.H. (1982). Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* **300**, 143-149.

Takeya T., Hanafusa H. (1983). Structure and sequence of the cellular gene homologous to the RSV src gene and the mechanism for generating the transforming virus. *Cell* **32**, 881-890.

Taub R., Kirsch I., Morton C., Lenoir G., Swan D., Tronick S., Aaronson S., Leder P. (1982). Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *PNAS* **79**, 7837-7841.

Taub R., Moulding C., Battey J., Murphy W., Vasicek T., Lenoir G.M., Leder P. (1984a). Activation and somatic mutation of the translocated c-myc gene in Burkitt Lymphoma Cells. *Cell* **36**, 339-348.

Taub R., Kelly K., Battey J., Latt S., Lenoir G.M., Tantravahi U., Tu Z., Leder P. (1984b). A novel alteration in the structure of an activated c-myc gene in a variant t(2;8) Burkitt Lymphoma. *Cell* **37**, 511-520.

Tilghman S.M., Tiemeier D.C., Polsky F., Edgell M.H., Seidman J.G., Leder A. (1977). Cloning specific segments of the mammalian genome: Bacteriophage λ containing mouse globin and surrounding sequences. *PNAS* **74**, 4406.

Tonegawa S., Brack C., Hozumi N., Schuller R. (1977). Cloning on the immunoglobulin variable region gene from mouse embryo. *PNAS* **74**, 3518.

Trent J., Meltzer P., Rosenblum M., Harsh G., Kinzler K., Mashal R., Feinberg A., Vogelstein B. (1986). Evidence for rearrangement, amplification, and expression of c-myc in a human glioblastoma. *PNAS* **83**, 470-473.

Tsichlis P.N., Strauss P.G., Hu L.F. (1983). A common region for

proviral DNA integration in MoMuLV-induced rat thymic lymphomas. *Nature* **302**, 445-449.

Tsichlis P.N., Strauss P.G., Kozak C. (1984). Cellular DNA region involved in induction of thymic lymphomas (Mlvi-2) maps to mouse chromosome 15. *Mol.Cell.Biol.* **4**, 997-1000.

Tsichlis P.N., Strauss P.G., Lohse M.A. (1985). Concerted DNA rearrangements in Moloney murine leukemia virus-induced thymomas: a potential synergistic relationship in oncogenesis. *J.Virol.* **56**, 258-267.

Upton A.C. (1987). Strahlenrisiko im Alltag. In: Krebs - Tumoren, Zellen, Gene. Spektrum der Wissenschaft, Verlagsgesellschaft, Heidelberg. 22-31.

Vande Woude G.F., Oskarsson M., Enquist L.W., Nomura S., Fischinger P.J. (1979). Cloning of integrated Moloney sarcoma proviral DNA sequences in bacteriophage λ . *PNAS* **76**, 4464.

Verma I.M., Sassone-Corsi P. (1987). Proto-oncogene fos: complex but versatile regulation. *Cell* **51**, 513-514.

Vieira J., Messing J. (1982). The pUC plasmids, and M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**, 259-268.

Vijver van de M., Bersselaar van de R., Devillee P., Cornelisse C., Peterse J., Nusse R. (1987). Amplification of the neu (c-erbB-2) oncogene in human mammary tumors is relatively frequent and is often accompanied by amplification of the linked c-erbA oncogene. *Mol.Cell.Biol.* **7**, 2019-2023.

Wagner E.F., Müller R. (1986). A role for proto-oncogenes in differentiation? In: *Oncogenes and Growth Control*. Springer-Verlag Berlin, 19-26.

Wahl G.M., Stern M., Stark G.R. (1979). Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzoxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *PNAS* **76**, 3683.

Weinstein I.B., Gattoni-Celli S., Kirschmeier P., Lambert M., Hsiao W., Backer J., Jeffrey A. (1984). Multistage carcinogenesis involves multiple genes and multiple mechanisms. In: *The transformed Phenotype*. Cancer Cells Band 1, Cold Spring Harbor, 229-237.

Westin E.H., Wong-Staal F., Gelmann E.P., Dalla-Favera R., Papas T.S., Lautenberger J.A., Eva A., Reddy E.P., Tronick S.R., Aaronson S.A., Gallo R.C. (1982). Expression of cellular homologues of retroviral oncogenes in human hematopoietic cells. *PNAS* **79**, 2490-2494.

Wetmur J.G., Davidson N. (1968). *J.Mol.Biol.* **31**, 349-370.

Willecke K., Schäfer R. (1984). Human oncogenes. *Hum. Genet.* **66**, 132-142.

Wiman K.G., Clarkson B., Hayday A.C., Salto H., Tonegawa S., Hayward W.S. (1984). Activation of a translocated c-myc gene: Role of structural alterations in the upstream region. *PNAS* **81**, 6798-6802.

Winnacker E.-L. (1984). *Gene und Klone*. Verlag Chemie, Weinheim.

Wong A.J., Ruppert J.M., Eggleston J., Hamilton S.R., Baylin S.B., Vogelstein B. (1986). Gene amplification of c-myc and N-myc in small cell carcinoma of the lung. *Science* 233, 461-464.

Yamamoto K.R., Alberts B.M., Benzinger R., Lawhorne L., Traeiber G. (1970). Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. *Virology* 40, 734.

Yander G., Halsey H., Kenna M., Augenlicht L.H. (1985). Amplification and elevated expression of c-myc in a chemically induced mouse colon tumor. *Cancer Res.* 45, 4433-4438.

Yang J.-Q., Bauer S.R., Mushinski J.F., Marcu K.B. (1985). Chromosome translocations clustered 5' of murine c-myc gene qualitatively affect promoter usage: implications for the site of normal c-myc regulation. *EMBO* 4, 1441-1447.

Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.

Yokota J., Tsunetsugu-Yokota Y., Battifora H., Le Fevre C., Cline M.J. (1986). Alterations of myc, myb, and ras^{Ha} Proto-oncogenes in cancers are frequent and show clinical correlation. *Science* 231, 261-265.

Yuasa Y., Srivastava S.K., Dunn C.Y., Rhim J.S., Reddy E.P., Aaronson S.A. (1983). Acquisition of transforming properties by alternative point mutations within c-bas/has human proto-oncogene. *Nature* 303, 775-779.

Yunis J.J. (1981). Specific fine chromosomal defects in cancer: an overview. *Hum.Path.* 12, 503-515.

Zarkower D., Wickens M. (1987). Formation of mRNA 3' termini: stability and dissociation of a complex involving the AAUAAA sequence. *EMBO* 6, 177-186.

Lebenslauf von Silvia Sturm

Geboren am 6.6.56 in Gersthofen

Eltern: Elfriede und Siegfried Sturm

1962-1967 Volksschule Gersthofen

1967-1976 Maria-Theresia Gymnasium Augsburg
naturwissenschaftlicher Zweig

WS 76/77 Beginn des Biologiestudiums an der Ludwig
Maximilian Universität München

WS 78/79 Vordiplomsprüfung

SS 81 mündliche Diplomprüfung

22.11.83 Abgabe der Diplomarbeit bei Prof. Wickler am
Max-Planck-Institut für Verhaltensphysiologie
Seewiesen

Thema: Paarbildung und Brutbiologie beim Roten
Sichler (Eudocimus ruber) unter Zoo-
bedingungen.

12.1983 Beginn der Doktorarbeit bei Prof. Hagen am
Institut für Strahlenbiologie in der Gesellschaft
für Strahlen- und Umweltforschung München.

15.2.84- Zeitangestellte der GSF München
30.4.84

1.8.84- Wissenschaftliche Hilfskraft der GSF München
31.7.87

